

Philipps



Universität
Marburg

Aus dem medizinischen Zentrum für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

DER BAUERNHOFEFFEKT ALS MODELLSITUATION ZUR
HYGIENEHYPOTHESE – EINBLICKE IN PRÄNATALE IMMUNOLOGISCHE
REGULATIONSMECHANISMEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dorothee Quast aus Ostercappeln

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
16.12.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. H. Renz

Korreferent: PD Dr. M. Zemlin

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Atopische Erkrankungen	3
1.2. Immunologische Grundlagen	4
1.3. Lymphozyten	6
1.4. Immunologisches Gedächtnis	10
1.5. Zytokine	11
1.6. Hygienehypothese	15
1.7. Bauerneffekt	19
1.8. PASTURE-Studie	25
1.9. Zielsetzung und Fragestellung	26
 2. Material und Methoden	 28
2.1. Materialübersicht	28
2.2. Studiendesign PASTURE-Studie	28
2.3. Studienzentrum Österreich	30
2.4. Studienpopulation	31
2.5. Qualitätskontrolle	32
2.6. Probenanalyse mittels ELISA	33
2.7. Statistische Auswertung	37
 3. Ergebnisse	 39
3.1. Studienpopulation	39
3.2. Soziodemographische und bauernhofspezifische Charakteristiken	41
3.3. Zytokinmessungen	48
3.4. Demographische Einflussgrößen und Zytokinwerte	50
3.5. Bauernhofftypische Expositionen und Konsum von Bauernprodukten	52
 4. Diskussion	 63
 5. Literaturverzeichnis	 80

6. Anhang	93
7. Zusammenfassung	95
8. Verzeichnis der akademischen Lehrer	99
9. Danksagung	100
10. Puplikation	101

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigen presenting cells (Antigenpräsentierende Zellen)
AD	Atopische Dermatitis
ALEX-study	The Allergy and Endotoxin study
CBMC	Cord Blood Mononuclear Cell (Mononukleäre Zellen des Nabelschnurblutes)
CD	Cluster of differentiation
CTLA4	
ELISA	Enzym-Linked-Immuno-Assay
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
GITR	Glucocorticoid-Induced TNF-Related Receptor
IFN- γ	Interferon γ
Ig-E	Immunglobulin der Klasse E
Ig-G	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Children
MHC	Major Histocompatibility Complex
PASTURE	Protection Against Allergy Study In Rural Environments
PBS	Phosphor Buffered Saline
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
Tab	Tabelle
TH 1,2,3	T-Helfer-Zelle 1,2,3
TNF α , β	Tumornekrosefaktor α , β
Treg	Regulatorische T-Zelle

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Seite
Tab. 3.1. Studienzentren und Kohortenzuteilung	39
Tab. 3.2. Soziodemographische Faktoren der PASTURE-Gesamtpopulation	42
Tab. 3.3. Typische Verhaltensweisen des traditionellen Bauernhoflebens in der PASTURE-Gesamtpopulation	43
Tab. 3.4. Soziodemographische Faktoren der Studienteilpopulation Österreich	46
Tab. 3.5. Typische Verhaltensweisen des traditionellen Bauernhoflebens in der Studienteilpopulation Österreich	47
Tab. 3.6. Effekt von demographischen Faktoren auf die Zytokinproduktion von CBMCs (PASTURE-Gesamtpopulation)	51
Tab. 3.7. Effekt des Bauernstatus auf die Zytokinproduktion von CBMCs (PASTURE-Gesamtpopulation)	56
Tab. 3.8. Effekt von Bauernhofexpositionen auf die Zytokinproduktion von CBMCs (PASTURE-Gesamtpopulation)	57
Tab. 3.9. Effekt des Konsums von Bauernprodukten auf die Zytokinproduktion von CBMCs (PASTURE-Gesamtpopulation)	58
Tab. 3.10. Effekt des Bauernstatus auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)	59
Tab. 3.11. Effekt des Aufenthalts der Mutter im Stall während der Schwangerschaft auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)	59
Tab. 3.12. Effekt des Aufenthalts der Mutter im Heuschober während der Schwangerschaft auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)	60
Tab. 3.13. Effekt des Kontaktes der Mutter zu Stalltieren während der Schwangerschaft auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)	60

Tab. 3.14.	Effekt des Konsums von Bauernmilch während der Schwangerschaft auf Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)	61
Tab. 3.15.	Effekt des Konsums von Bauerbutter während der Schwangerschaft auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)	61
Tab. 3.16.	Effekt des Konsums von Bauernjoghurt während der Schwangerschaft auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)	62
Tab. 6.1.	Materialübersicht	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung		Seite
Abb. 1.1.	Jährliche Prävalenzveränderungen asthmatischer Symptome und allergischer Rhinokonjunktivitis unter 6-7-jährigen und 13-14-jährigen Kindern zwischen ISAAC Phase I (1992-1998) und Phase III (1999-2004)	1
Abb. 1.2.	Klassische Mechanismen der allergischen Sensibilisierung und Reaktion	5
Abb. 1.3.	Differenzierung von T-Lymphozyten	7
Abb. 1.4.	TH2 vermittelte immunologische Mechanismen, die zu entzündlichen Veränderungen der Atemwege beim Asthma bronchiale führen	9
Abb. 1.5.	Inzidenz von Infektionen und chronischen Entzündungen (1960-2000)	15
Abb. 1.6.	Auswirkungen von Stallkontakt und Konsum von Bauernmilch	20
Abb. 1.7.	Kontrolle der TH2-Zellen durch Tregs und TH1-Zellen	24
Abb. 2.1.	Studienzentren PASTURE	28
Abb. 2.2.	Übersichtskarte Land Salzburg, Österreich	30
Abb. 3.1.	Studienteilnehmer PASTURE	40
Abb. 3.2.	Prävalenz und Verteilung der Zytokine	49
Abb. 4.1.	Effekt der Bauernhofexpositionen auf die IFN- γ -Werte im Nabelschnurblut	65
Abb. 4.2.	Effekt der Bauernhofexpositionen auf die IL-10-Werte in den österreichischen Nabelschnurblutproben	68

1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat die Prävalenz der atopischen Erkrankungen, zu denen neben dem Asthma bronchiale das atopische Ekzem sowie die allergische Rhinitis gehören, in den westlichen Industrienationen signifikant zugenommen¹⁰. Weltweit leiden derzeit bis zu 20% der Bevölkerung unter allergischen Beschwerden¹⁶⁹. Vor allem Kinder sind betroffen, wobei das Asthma bronchiale die häufigste chronische Erkrankung bei Kindern darstellt¹⁷¹.

Die International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) untersuchte die Prävalenzen von allergischen Erkrankungen unter mehr als 200.000 Schulkindern weltweit im Zeitraum von 1992 bis 2004 und konnte zeigen, dass vor allem die Industriestaaten und dabei vor allem die englischsprachigen Länder von den enormen Prävalenzanstiegen der Allergien betroffen sind. Innerhalb Europas besteht ein Ost-West-Gefälle, wobei in Osteuropa die niedrigsten Erkrankungsraten vorliegen.

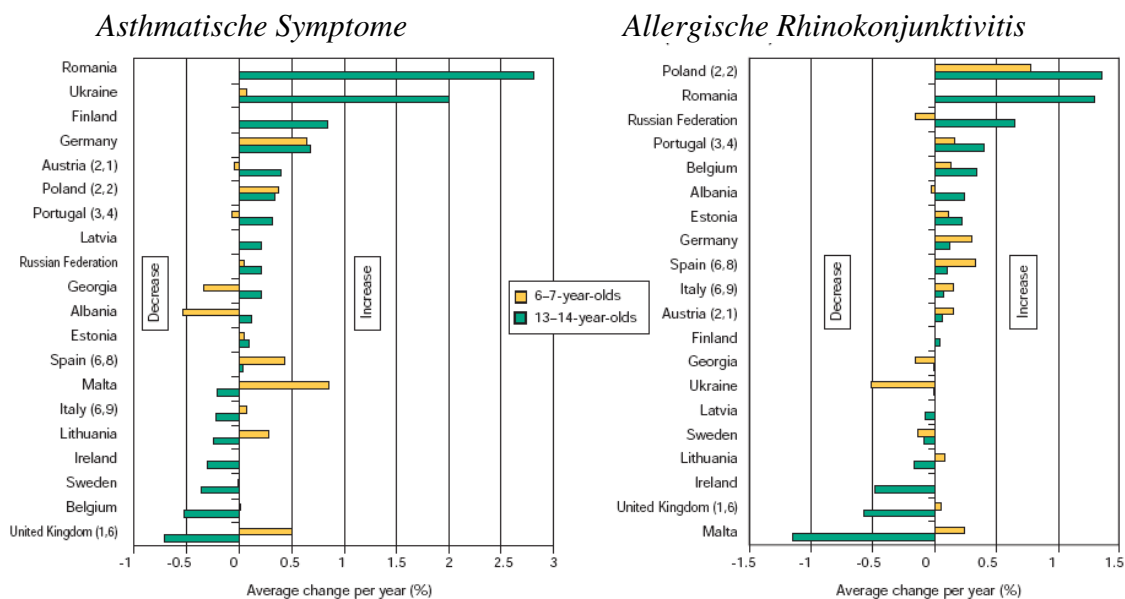


Abbildung 1.1.: Jährliche Prävalenzveränderungen asthmatischer Symptome und allergischer Rhinokonjunktivitis unter 6-7-jährigen und 13-14-jährigen Kindern zwischen ISAAC Phase I (1992-1998) und Phase III (1999-2004)¹⁷²

In Klammern: Anzahl der Studienzentren (6-7-Jährige, 13-14-Jährige), wenn >1

Die in der ISAAC-Studie erhobenen Daten für Deutschland und Österreich (Phase I) lagen im mittleren Prävalenzbereich der Ergebnisse. (Prävalenzen: 13-14-Jährige 1995: Deutschland (Münster): Asthma: 7%, Allergische Rhinokonjunktivitis: 21,1%,

Atopisches Ekzem: 10,0%; Österreich (Salzburg): Asthma: 6,3%, Allergische Rhinokonjunktivitis: 20,0%, Atopisches Ekzem: 4,4%) ¹⁴⁵. Es ist davon auszugehen, dass die Prävalenzen der atopischen Erkrankungen in den kommenden Jahren europaweit weiter ansteigen ¹⁷¹.

Der Prävalenzanstieg sowie der enorme „burden of disease“ machen deutlich, wie wichtig weitere Forschung auf dem Gebiet der Allergologie ist. Trotz umfangreicher Studien zum Thema der Atopie ist noch immer nicht abschließend geklärt, was genau diese Erkrankungen auslöst, was ihre Entwicklung begünstigt und wie eine ursachenbezogene Atopieprävention aussehen könnte. Hinsichtlich der Ursachen für den Prävalenzanstieg atopischer Erkrankungen werden zahlreiche Einflussfaktoren diskutiert. Inzwischen bekannt ist, dass genetische Faktoren eine wichtige Rolle spielen bei der Entwicklung von Allergien. In den letzten Jahren sind viele Gen-Polymorphismen identifiziert worden, die eine Assoziation zur Manifestation von allergischen Erkrankungen zeigen ^{21,34,64,106}. Die genetischen Faktoren können jedoch nicht alleine die Prävalenzveränderungen der allergischen Erkrankungen in den Industriestaaten erklären. Das rasante Tempo des Prävalenzanstieges, sowie die regional unterschiedlichen Verteilungsmuster machen es wahrscheinlich, dass auch Unterschiede in Lebensstil und Lebensbedingungen bzw. bestimmte Umweltfaktoren und Interaktionen zwischen diesen Faktoren und den Genen eine Rolle spielen ⁹⁹.

Zwei Erklärungsmodelle werden dazu diskutiert: zum Einen die so genannte „Umwelthypothese“, nach der bestimmte Umweltfaktoren, wie z.B. Zigarettenrauch oder die Schadstoffbelastung der Luft, zu einer verstärkten Allergisierung durch natürlich vorkommende Allergene beitragen können sowie zum Anderen die so genannte „Hygienehypothese“, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.1. Atopische Erkrankungen

Zu den Erkrankungen des atopischen Formenkreises zählen das Asthma bronchiale, die Allergische Rhinitis und die atopische Dermatitis. Sie alle zeichnen sich durch das Vorhandensein allergenspezifischer IgE-Antikörper aus ¹⁷⁰.

Das Asthma bronchiale ist eine chronische Entzündung der Atemwege, die durch bronchiale Hyperreaktivität und variable Atemwegsobstruktion charakterisiert ist. Bei anfälligen Personen verursacht sie rezidivierende Anfälle, die mit pfeifender Atmung (Giemen), Kurzatmigkeit, Atemnot sowie Husten einhergehen. Besonders nachts bzw. in den frühen Morgenstunden treten diese Anfälle auf. Die Prävalenz des Asthma bronchiale bei Kindern und Jugendlichen beträgt in Deutschland circa 10% ¹⁴⁵.

Die Allergische Rhinitis ist eine allergische Entzündung der Nasenschleimhäute, welche oft von Konjunktivitis begleitet wird (Rhinokonjunktivitis). Sie tritt häufig nur zu bestimmten Jahreszeiten auf, kann jedoch auch einen chronischen Verlauf zeigen. Da vor allem inhalierte Graspollen die allergischen Reaktionen hervorrufen, wird die Krankheit landläufig als „Heuschnupfen“ bezeichnet. 2003 lag die Gesamtprävalenz der Allergischen Rhinitis bei 15-20% ¹⁷⁰.

Bei dem atopischem Ekzem (Synonym: atopische Dermatitis, Neurodermitis) handelt es sich um eine entzündliche Hauterkrankung, die sich durch altersabhängig unterschiedliche Verteilung der betroffenen Hautareale auszeichnet. Häufig ist sie das erste Symptom atopischer Patienten. Vor allem die Prävalenz der vor dem Alter von sieben Jahren auftretenden atopischen Dermatitis hat enorm zugenommen in den letzten Jahren, 2003 lag sie bei bis zu 24%. 10-20% der betroffenen Kinder erkranken zusätzlich an Asthma ¹⁷⁰.

1.2. Immunologische Grundlagen der Atopieentstehung

1.2.1. Allergie und Hypersensitivität

Allergische Erkrankungen sind inflammatorische Funktionsstörungen des Immunsystems. Das adaptive Immunsystem schützt vor Infektionen, manchmal jedoch kommt es zu überschießenden und inadäquaten immunologischen Reaktionen, so genannter Hypersensibilität. 1963 entwickelten Coombs und Gell ein Klassifizierungsschema, indem sie die Hypersensibilitätsreaktionen in vier Gruppen einteilten. Atopische Erkrankungen ordneten sie der Typ-I-Reaktion zu¹²⁸.

Eine allergische Reaktion entsteht, wenn das Immunsystem auf ein so genanntes Allergen eine unverhältnismäßig starke Reaktion zeigt. Unter einem Allergen versteht man dabei ein eigentlich harmloses Umweltantigen, das bei Gesunden keine Immunantwort auslöst¹¹. Eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Allergie kommt IgE zu, das unter anderem auch im Rahmen von parasitären Erkrankungen vermehrt gebildet wird⁸⁷.

1.2.2. Phasen der Allergischen Entzündungsreaktion

Die Entwicklung einer allergischen Reaktion wird in zwei Phasen eingeteilt, die jedoch gleichzeitig ablaufen: die Sensibilisierungsphase und die Effektorphase:

Sensibilisierungsphase: Bei erstmaligem Kontakt mit einem Allergen kommt es vermittelt durch die TH2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 zur IgE-Produktion durch B-Zellen, die gegen das Allergen gerichtete B-Zell-Rezeptoren tragen. Das IgE bindet an Rezeptoren von Mastzellen und basophilen Granulozyten, den so genannten Fcε-Rezeptoren. Diese Vorgänge sensibilisieren den Organismus gegenüber diesem Allergen¹¹.

Effektorphase: Trifft der sensibilisierte Mensch nun erneut mit dem entsprechenden Allergen zusammen, so kommt es zu einer Kreuzvernetzung der Fcε-Rezeptoren auf den sekretorischen Zellen über die gebundenen IgE. Die so genannte Effektorphase beginnt. Durch die Kreuzvernetzung der Rezeptoren werden die sekretorischen Zellen aktiviert und geben den Inhalt ihrer Granula durch Exozytose an die Umgebung ab.

Außerdem bilden sie Zytokine und Derivate der Arachidonsäure. Sowohl Mastzellen als auch basophile Granulozyten speichern in ihren Granula Proteasen und Histamin, wobei vor allem Histamin die allergischen Beschwerden auslöst. Unterschieden werden eine frühe sowie eine späte allergische Reaktion ¹¹.

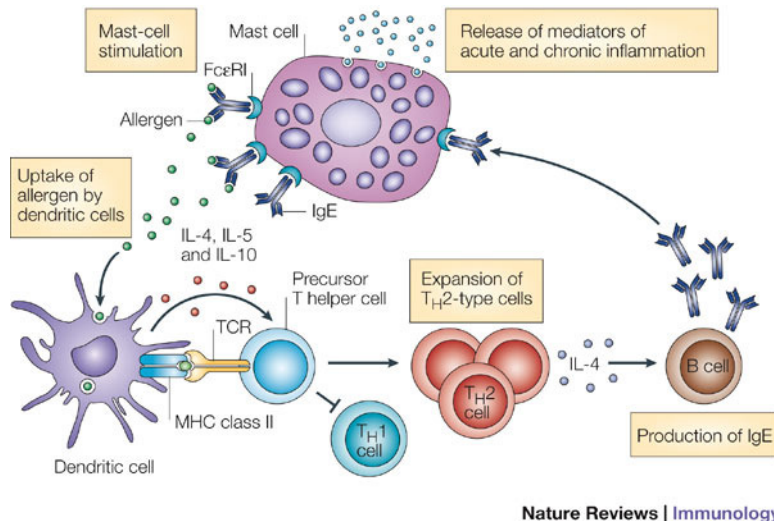


Abbildung 1.2.: Klassische Mechanismen der allergischen Sensibilisierung und Reaktion, Cookson et al. 2004 ³⁴

Haut und Schleimhäute sind Bestandteile der natürlichen Immunität. Sie stellen eine physikalische Barriere gegenüber der Umwelt dar und sind die erste Kontaktstation für fremde Substanzen. Gerade diese Oberflächen, wie Haut, Nasen-, Rachen- und Bronchialschleimhaut und Konjunktiven, reagieren daher mit allergischen Entzündungsreaktionen. Schon kleinste Mengen des Allergens reichen bei sensibilisierten Personen aus, um eine starke allergische Antwort auszulösen ¹¹.

1.3. Lymphozyten

Eine wichtige Rolle innerhalb der Mechanismen der Allergie kommt den Lymphozyten zu. Lymphozyten entwickeln sich aus lymphatischen Stammzellen, die sich von den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ableiten. Lymphatische Stammzellen finden sich in der frühen Fetalzeit in der Leber und später im Knochenmark. Im Verlauf der Ontogenese wandern Lymphozytenvorläufer aus den hämatopoetischen Organen mit dem Blut in die primären lymphatischen Organe Knochenmark und Thymus. Hier vermehren sie sich. Darüber hinaus machen sie eine morphologische und funktionelle Entwicklung durch, in der sie die für ihre Art typischen Fähigkeiten erwerben. Dieser Prozess wird als Lymphozytenprägung bezeichnet. Lymphozyten, die im Knochenmark geprägt worden sind, werden B-Lymphozyten genannt (B: Bursa Fabricii oder Bone marrow). Lymphozyten, die im Thymus geprägt worden sind, werden T-Lymphozyten genannt. B- und T-Lymphozyten wandern von den primären lymphatischen Organen zu den sekundären lymphatischen Organen Lymphknoten und Milz. Sie bilden hochspezifische Antigen-Rezeptoren ohne jemals mit dem dazu passenden Antigen in Kontakt gekommen zu sein.

Zu den T-Lymphozyten gehören etwa 70-80% der Lymphozyten im Blut. Sie bewirken die zelluläre Immunreaktion. Sie halten sich in den sekundär lymphatischen Organen Lymphknoten und Milz auf. Nach antigener Stimulation vermehren sie sich und differenzieren zu T-Effektor- oder T-Gedächtniszellen.

Anhand bestimmter Oberflächenkennzeichen unterscheidet man zwischen CD4+ Zellen, den T-Helfer Zellen sowie CD8+ Zellen, den zytotoxischen T-Zellen.

1.3.1. T-Helferzellen

Naive CD4+-Zellen produzieren nach Antigenkontakt IL-2 und proliferieren. Dabei entstehen TH0-Zellen (T-Helferzellen). Je nach Erkrankung bilden sich aus TH0-Zellen entweder TH1- oder TH2-Zellen. Virale und manche bakterielle Infektionen fördern die Bildung von TH1-Zellen (gefördert durch IL-12 und IFN- γ), während z.B. Wurminfektionen die Bildung von TH2-Zellen begünstigen (stimuliert durch IL-4). Als Teil ihrer Differenzierung verlieren die T-Zellen ihre „Lymphknoten-Homing-Rezeptoren“ und weisen stattdessen Rezeptoren auf, die ihnen eine Wanderung in

entzündete, nicht lymphatische Gewebe ermöglichen, wo sie ihre Effektorfunktionen ausführen können¹³⁸.

T-Lymphozyten erkennen ihr Antigen nicht direkt, sondern sind angewiesen auf eine Präsentation des Antigens durch so genannte Antigenpräsentierende Zellen (APCs), welche die Antigene aufnehmen, in Fragmente zerlegen und über MHC-Rezeptoren an ihrer Oberfläche den Lymphozyten präsentieren. Zu den APCs gehören B-Lymphozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen. Die T-Lymphozyten erkennen das präsentierte Antigen und werden zur Proliferation und zur Differenzierung in Effektorzellen angeregt, die dann der Infektion entgegenwirken.

Ob TH1- oder TH2-Zellen entstehen, hängt neben der Art des Antigens auch von den Zytokinen ab, die von den APCs freigesetzt werden, sowie von der Menge des Antigens. Bakterielle Antigene, und hohe Antigendosen führen dabei zu Sekretion von IL-12 durch APCs, das zu einer TH1-Differenzierung führt, während niedrige Antigendosen, IL-4 und IL-6 die Entwicklung von TH2-Zellen begünstigen^{11,97,114}.

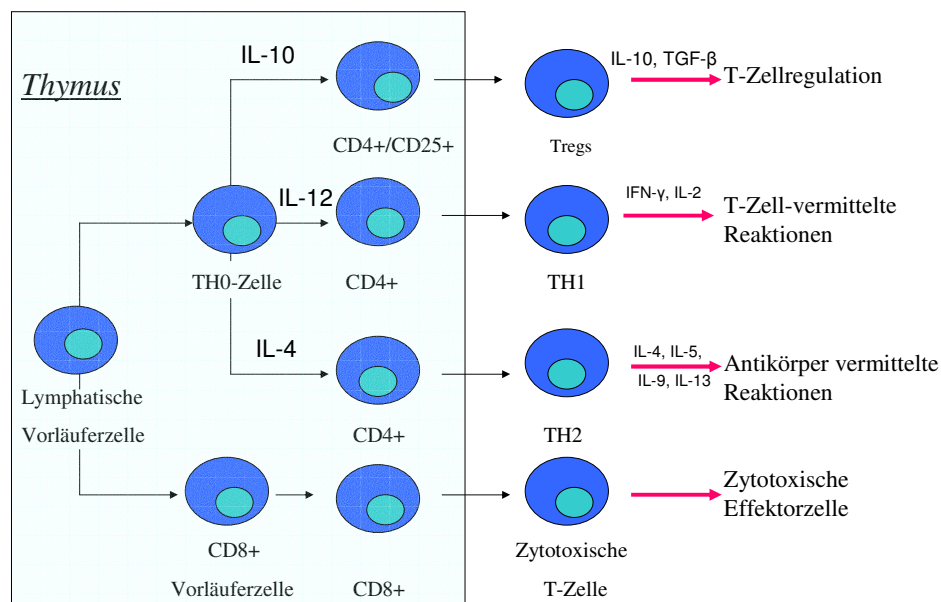


Abbildung 1.3.: Differenzierung von T-Lymphozyten

B-Lymphozyten erkennen Antigene über zellgebundene Immunglobuline an ihrer Oberfläche. Als APC präsentieren sie das Erregerfragment an ihrer Oberfläche den T-Lymphozyten, die es über ihre T-Zell-Rezeptoren erkennen. Durch Stimulation über

Interleukine kommt es zur selektiven klonalen Vermehrung und Differenzierung derjenigen B-Zellen, die den zum Erreger passenden Antigen-Rezeptor tragen. Sie reifen zu Plasmazellen heran und sezernieren als solche schließlich lösliche Immunglobuline, die so genannten Antikörper. Es gibt 5 verschiedene Klassen von Antikörpern: IgG, IgA, IgE, IgD und IgM.

1.3.2. TH1 und TH2-Zellen

Die Unterteilung der T-Zellen basiert im Wesentlichen auf der Analyse ihres Zytokinprofils. TH1-Zellen setzen IFN- γ , TNF- β sowie IL-2 frei ¹³⁴, wodurch die zellvermittelte Immunreaktion aktiviert wird, während TH2-Zellen durch Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, sowie IL-13 ¹³⁴ die humorale Immunreaktion fördern, indem sie B-Lymphozyten stimulieren und sie zur Produktion von Antikörpern, vor allem IgG1 und IgE2, anregen ¹¹. Die TH-Untertypen regulieren sich gegenseitig: indem TH1-Zellen IFN- γ sezernieren, inhibieren sie die Proliferation von TH2-Zellen ¹³³, während von TH2-Zellen produziert IL-10 die IL-12-Sekretion von Monozyten herunterreguliert und IL-4 die Produktion des IL-12-Rezeptors auf TH1-Zellen, was wiederum die Aktivität der TH1-Zellen inhibiert. Eine Immunantwort neigt also dazu sich in TH1- oder TH2-Richtung zu bewegen.

1.3.3. Regulatorische T-Zellen

Neben TH1- und TH2-Zellen gibt es noch eine dritte Subklasse: die regulatorischen T-Zellen (Tregs). Antigenpräsentation in Anwesenheit von IL-10 und IFN- γ fördert die Differenzierung solcher Tregs. Diese haben eine immunsuppressive Wirkung auf TH1- und TH2-Zellen, indem sie inhibitorische Zytokine sezernieren und auf ihrer Oberfläche negativ kostimulatorische Moleküle wie CTLA4 und GITR (Glucocorticoid-Induced TNF Receptor) exprimieren ^{115,125}. Aufgrund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften werden Tregs auch als T-Suppressorzellen bezeichnet.

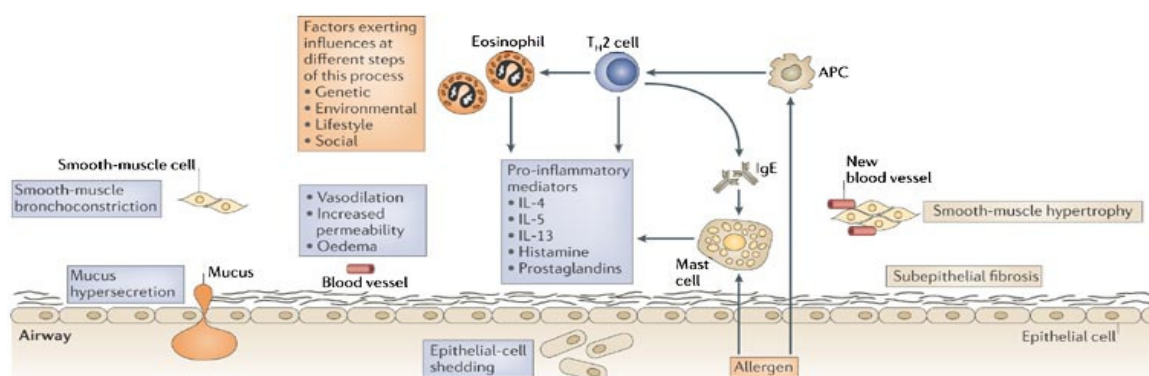
Harmlose Fremdstoffe wie Nahrungsmittel oder Staubpartikel werden täglich in großer Menge über den Mund und die Nase aufgenommen. Damit diese keine Abwehrreaktion des Körpers hervorrufen, bildet das Immunsystem spezifische Zellen, wie Tregs aus. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer oralen Toleranzinduktion ¹²⁵.

Fehlende Treg vermittelte TH2-Supprimierung wurde in Verbindung gebracht mit der Entstehung von allergischen Erkrankungen^{144,173}.

1.3.4. Das TH1/TH2-Modell

Manche Menschen sind prädisponiert für die Entwicklung einer Allergie, bei ihnen besteht eine so genannte Atopie. Molekularbiologisch entspricht dieses einem Ungleichgewicht zwischen verschiedenen T-Helferzellen. Unterschieden werden bei den CD4+-T-Helferzellen wie beschrieben TH1- und TH2-Zellen. Im Körper liegen die TH1- und TH2-Zellen in einem bestimmten Verhältnis vor, das darüber entscheidet, ob die humorale oder zelluläre Abwehr überwiegt. Liegt nun das TH1/TH2-Gleichgewicht auf Seiten der TH2-Zellen, besteht eine Atopie.

Allergische Beschwerden sind TH2-vermittelte Krankheiten⁵⁹. Indem TH2-Zellen bestimmte Interleukine (IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13) sezernieren, werden Mechanismen in Gang gesetzt, welche die charakteristischen Reaktionen der allergischen Immunantwort nach sich ziehen: nach einem Antikörpershift sezernieren Plasmazellen vermehrt IgE und eosinophile Granulozyten werden vermehrt rekrutiert, ihre Proliferation und Differenzierung wird angeregt und konsekutiv kommt es zu einer vermehrten Mukus-Produktion in den Luftwegen und im Gastrointestinaltrakt^{11,28}.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Abbildung 1.4.: TH2 vermittelte immunologische Mechanismen, die zu entzündlichen Veränderungen der Atemwege beim Asthma bronchiale führen; Devereux et al. 2006⁴²

1.4. Immunologisches Gedächtnis

Bei der Aktivierung von T-Lymphozyten können so genannte Gedächtniszellen entstehen^{67,124}. Der Vorgang, bei dem ein Antigen zum ersten Mal von einer APC einer T-Zelle präsentiert wird, wird „Priming“ genannt. Bei wiederholtem Antigenkontakt reagiert das Immunsystem dann rascher und mit stärkerer Antikörperproduktion als beim Primärkontakt. Eventuell treten dann überhaupt keine Krankheitssymptome mehr auf, denn der Organismus ist jetzt immun gegen das Antigen. Der vorherrschende Typ einer Immunantwort auf ein spezifisches Antigen, Richtung TH1 oder Richtung TH2, wird bestimmt durch eben diesen ersten Kontakt mit dem Antigen. Der Antigenkontakt bewirkt, dass sich aus der naiven Zelle Effektorzellen, entweder des TH1- oder des TH2-Typs entwickeln. Neben den Effektorzellen bilden sich auch Gedächtniszellen, entweder prä-TH1-Gedächtniszellen oder prä-TH2-Gedächtniszellen. Tritt der Organismus zum zweiten Mal in Kontakt mit dem Antigen, werden diese Gedächtniszellen aktiviert und es bilden sich entsprechend des Typs der Gedächtniszelle TH1- oder TH2-Effektorzellen. Damit haben Individuen, die eine effiziente TH1-Antwort auf ein Allergen entwickelt haben, eine geringere Anfälligkeit dafür eine allergische Reaktion zu entwickeln.

1.5. Zytokine

Zytokine sind extrazelluläre Glykoproteine, die an der Signalweitergabe und damit der Kommunikation zwischen den Zellen während der Immunantwort beteiligt sind. Sie sind essentiell für den Ablauf von Zell-Zell-Interaktionen und werden von verschiedenen Zelltypen gebildet.

Zytokine wirken über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen. Unter dem Begriff Zytokine werden Interleukine (IL), die hauptsächlich von T-Lymphozyten produziert werden, Interferone (IFN), die unter anderem wichtig sind für die Eingrenzung der Ausbreitung einer viralen Infektion, koloniestimulierende Faktoren und Chemokine zusammengefasst. Zytokine haben im Allgemeinen eine parakrine Wirkung. Außerdem können sie auch auf entfernte Zellen und sogar auf ihre Ausgangszelle wirken und somit auch endokrine und autokrine Effekte haben.

Eine Vielzahl von Zellfunktionen der Zielzellen wird durch Zytokine beeinflusst. Dieses beinhaltet Zellaktivierung, Proliferation, Chemotaxis, Immunsteuerung, Freisetzung weiterer Zytokine oder Mediatoren, Zellwachstum, Zelldifferenzierung und auch Apoptose. Dabei hat jedes Zytokin viele verschiedene Funktionen, und jede dieser Funktionen wird wiederum von mehr als einem Zytokin vermittelt. Die Wirkungen von Zytokinen werden durch Bindung an hochaffine Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle vermittelt. Die Zahl dieser Rezeptoren kann durch Aktivierung der Zielzelle erhöht werden, was wiederum die Antwort dieser Zelle verändert. Zielzellen können ihre eigene Zytokinproduktion durch Zytokine autokrin anregen oder parakrin zur Produktion von anderen Zytokinen anregen, die dann wiederum die eigene Zytokinproduktion verstärken.

Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse, wie sie im Rahmen allergischer Erkrankungen auftreten. Im Folgenden sollen die im Rahmen meiner Arbeit gemessene Zytokine kurz erläutert werden:

1.5.1. Interleukin 5

IL-5 ist ein 13 kDa schweres, disulfidgebundenes Homodimer, das aus 115 Aminosäuren besteht. Es wird hauptsächlich von TH2-Zellen gebildet und bewirkt Wachstum und Differenzierung von B-Lymphozyten. Es fördert die IgA-, IgM- und vor allem die IgE-Synthese. Zudem wirkt es als chemotaktischer und zentraler Faktor auf eosinophile und basophile Granulozyten. Sowohl Produktion, Reifung, Aktivierung als auch Lebensdauer von Eosinophilen werden beeinflusst^{32,91,174}. IL-5 kann das Knochenmark dazu veranlassen, vermehrt eosinophile Granulozyten freizusetzen. Um deren Gewebeinfiltration zu bewirken sind aber noch andere Faktoren notwendig³³. IL-5 ist vor allem für die Symptome des Asthma bronchiale verantwortlich und wird auch als Marker für die Entzündungsreaktion bei Asthmatikern benutzt, die erhöhte Serum-IL-5-Werte aufweisen³⁵.

1.5.2. Interleukin 10

Interleukin 10 ist ein 35-40 kDa schweres Molekül, das aus 160 Aminosäuren besteht. Es wird von TH0 und TH2-Zellen, aktivierten CD4+- und CD8+-Zellen, Monozyten, Dendritischen Zellen, Keratinozyten und außerdem im Rahmen der Rückkopplung von aktivierten Makrophagen gebildet. Auf letztere hat es eine hemmende Wirkung und dient damit der Kontrolle der unspezifischen Abwehr. Neben der IL-10-Produktion in zirkulierenden Monozyten findet ein großer Anteil der IL-10-Sekretion auch in den Alveolarmakrophagen der gesunden Lunge statt¹⁸.

IL-10 kann sowohl immunstimulierende als auch immunsuppressive Wirkungen entfalten. Es reguliert Wachstum und Differenzierung von B-Lymphozyten und inhibiert die Zytokinsynthese von TH1- (IFN- γ , IL-2) und TH2-Zellen (IL-4, IL-5)¹⁴¹, Makrophagen (IL-12) und Natürlichen Killerzellen. Über eine Herunterregulierung des MHC-II-Antigens auf Monozyten beeinflusst IL-10 die antigenpräsentierende Kapazität dieser Zellen und inhibiert damit die Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen³⁸. Sowohl die Überlebensdauer der eosinophilen Granulozyten als auch die durch IL-4 induzierte IgE-Produktion wird durch IL-10 inhibiert. Allerdings potenziert sich durch den IL-4-Einfluss die IgE-Produktion von bereits IgE-sekretorisch umgewandelten B-Lymphozyten⁷³.

1.5.3. Interleukin 12

IL-12 ist ein Heterodimer mit zwei Ketten (p35 und p40), die aus 196 bzw. 306 Aminosäuren bestehen und jeweils ein Gewicht von 30-33 bzw. 35-44 kDa haben. IL-12 ist ein Schlüsselfaktor, der die zellvermittelte Immunreaktion reguliert und starke TH1 aktivierende Fähigkeiten hat. Es wird von APCs, also B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und Dendritischen Zellen, sezerniert^{92,152}.

Als TH1-aktivierendes Zytokin induziert IL-12 in diesen Zellen die Synthese von IFN- γ , IL-2 und TNF- α ⁸⁵. Auch NK-Zellen werden zur vermehrten Sezernierung von IFN- γ angeregt. IFN- γ wiederum fördert die IL-12-Produktion der Makrophagen/Monozyten im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus. Auf TH2-Zellen hat IL-12 eine hemmende Wirkung. Zum einen hemmt es die Differenzierung der TH0-Zellen in TH2-Zellen, zum anderen vermindert es die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10 der TH2-Zellen⁹⁸. Zu einer Verminderung der IL-4-Produktion kommt es aufgrund der mit der TH1-Aktivierung verbundenen gesteigerten IFN- γ -Synthese. Auf diesem Weg bewirkt IL-12 indirekt eine Hemmung der IL-4-abhängigen IgE-Freisetzung⁸⁰. IL-12 spielt somit eine wichtige Rolle bei der Vermeidung einer überschießenden IgE-Produktion und bei der konsekutiven allergischen Entzündung.

1.5.4. Interferon γ

IFN- γ ist ein 40-70 kDa schweres Mono- oder Multimer, das aus 143 Aminosäuren besteht. Es wird von TH1-Zellen, CD8+-Zellen, NK-Zellen, Epithelien und Fibroblasten synthetisiert. IFN- γ ist ein Zytokin der späten Phase der TH1-Immunantwort und hemmt die Zytokinproduktion von TH2-Zellen¹³². T-Zellen produzieren IFN- γ nach Antigenstimulierung. NK-Zellen sezernieren dieses Zytokin, wenn sie fremde Strukturen erkennen oder unter dem Einfluss von IL-12.

IFN- γ zeigt ebenso wie die anderen Interferone (IFN- α , IFN- β) antivirale und antiparasitäre Fähigkeiten, wirkt jedoch stärker antiproliferativ als IFN- α und IFN- β ³⁷. Die Hauptaufgabe des IFN- γ liegt in der Aktivierung von Makrophagen und damit in einer Unterstützung der zellulären Abwehr. Durch die IFN- γ -Aktivierung sind Makrophagen in der Lage, reaktiven Sauerstoff und NO-Metabolite zu produzieren.

Zusätzlich fördert IFN- γ die Expression von MHC-I- und -II-Molekülen auf Antigenpräsentierenden Zellen, wodurch es zu verstärkter Antigenprozessierung kommt. IFN- γ induziert direkt die Sekretion von TNF- α , indem es Makrophagen/Monozyten stimuliert und erhöht indirekt die TNF- α -Produktion, indem es die IL-10-Produktion von Monozyten/Makrophagen hemmt^{31,43}.

INF- γ hat eine ausgeprägte und relativ spezifische hemmende Wirkung auf die IL-4 induzierte IgE- und IgG1-Synthese der B-Zellen¹³². Bei Asthma-Patienten konnte eine verringerte Produktion von IFN- γ nachgewiesen werden⁸². Der IFN- γ -Rezeptor leitet das Aktivierungssignal über JAK/STAT weiter.

1.5.5. Tumor-Nekrose-Faktor α

TNF- α ist ein 52 kDa schweres Molekül, das aus 17,4 kDa schweren Untereinheiten und 157 Aminosäuren besteht. TNF- α wird überwiegend von aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet. Unstimuliert exprimieren diese lediglich mRNA für TNF- α , es erfolgt jedoch keine Bildung des Proteins. Erst die Aktivierung der Zellen durch Bestandteile von Bakterien, z.B. durch das LPS gramnegativer Bakterien, Protozoen, Lymphokine oder Phagozytose von Mikroorganismen führt zur Freisetzung des Proteins TNF- α und zur Transkription weiterer TNF- α -DNA. TNF- α gehört zusammen mit IL-1 und IL-6 zu den wichtigsten Zytokinen der frühen Abwehr und der Entzündung. Dabei stimuliert TNF- α die Bildung von IL-1. TNF- α und IL-1 zusammen fördern die Bildung von IL-6. Werden TNF- α , IL-1 und IL-6 in entsprechenden Mengen gebildet, rufen sie Fieber, Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber und vermehrte Freisetzung von Lymphozyten aus dem Knochenmark hervor. Stark gesteigert werden kann die TNF- α -Sekretion der Monozyten/Makrophagen durch IL-1, GM-CSF und IFN- γ . Auch aktivierte T-Zellen, eosinophile Granulozyten und die Epithelzellen der Atemwege sind in der Lage TNF- α zu sezernieren^{36,41}.

1.6. Die Hygienehypothese

Erstmals formuliert wurde die Hygienehypothese 1989 von David P. Strachan. Dieser These zufolge führen moderne Gesundheits- und Hygienepraktiken zu einer relativen Sterilisation der Umwelt, welches mit einer reduzierten Exposition der Menschen durch Viren, Bakterien, Pilzen und ihren Komponenten einhergeht. Strachan nahm an, dass diese Komponenten einen allergieprotektiven Effekt haben. Die Überlegung, dass sie in der „sterileren“, modernen Welt nicht mehr in ausreichender Qualität und/oder Quantität vorhanden sind, führt gemäß Strachan zu einem Ungleichgewicht des Immunsystems, welches schließlich Individuen für die Entwicklung einer allergischen Krankheit prädisponiert¹⁴⁷.

Die Tatsache, dass der in den letzten Jahrzehnten beobachtete Prävalenzanstieg von allergischen Erkrankungen von einer enorm gesunkenen Inzidenz und Prävalenz von bakteriellen und viralen Infektionskrankheiten in dieser Periode begleitet ist¹², unterstützt Strachans Hygienehypothese. Erklären lässt sich dies unter anderem durch verbesserte Impfstoffe und Impfstrategien, sowie durch die strikte Verschreibung von Antibiotika. Außerdem haben sich die Lebensbedingungen im Laufe der Zeit erheblich verbessert, was durch einen viel höheren hygienischen Standard charakterisiert ist.

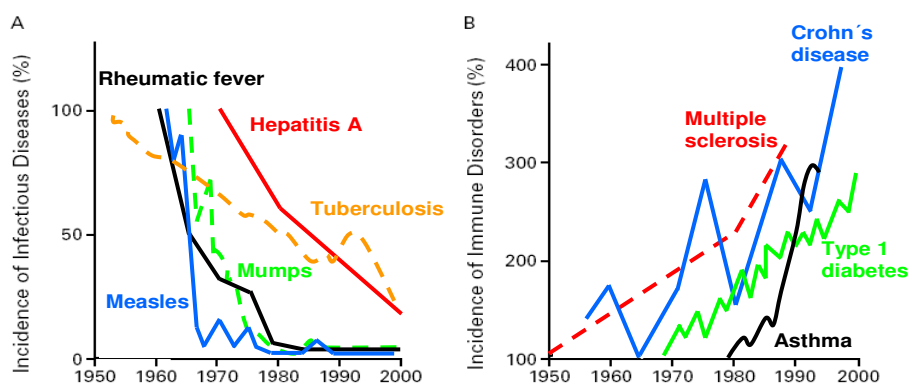


Abbildung 1.5.: Inzidenz von Infektionen und chronischen Entzündungen (1960-2000), modifiziert nach Bach et al.¹²

Zahlreiche weitere Studien bestätigen die Hygienehypothese ^{24,71,167}. Strachan fand heraus, dass Kinder mit vielen, vor allem älteren Geschwistern aufgrund von gegenseitiger Ansteckung unter den Kindern häufiger unter Infektionen des Respirationstraktes litten als ihre Altersgenossen, während gleichzeitig die Prävalenz von Heuschnupfen und Atopie mit einer größeren Anzahl an älteren Geschwistern abnahm ¹⁴⁶. Auch der Kontakt zu Gleichaltrigen in Kindertagesstätten ist mit einem gewissen Schutz vor der Entwicklung allergischer Erkrankungen verbunden ^{30,30,64}.

Interessanterweise haben Kinder aus Familien, die streng nach einer anthroposophischen Philosophie leben, was neben dem Verzehr von fermentiertem Gemüse, vor allem einen zurückhaltenden Gebrauch von Antibiotika beinhaltet, ein reduziertes Risiko für Atopie gegenüber ihren Altersgenossen ^{5,8}.

Ein Vergleich der Prävalenzen von Asthma, Giemen und allergischer Rhinitis in Ost- und Westdeutschland ergab, dass die Prävalenzen in Ostdeutschland signifikant niedriger waren als in Westdeutschland, obwohl beide Populationen einem identischen Genpool entsprangen und nur 40 Jahre getrennt worden waren ¹¹³. Es kann vermutet werden, dass der höhere Lebensstandard Westdeutschlands, der nach Strachan mit einer vermehrten Sterilisation der Umwelt einhergeht, sowie eventuell auch die in Ostdeutschland weit verbreiteten Kindertagesstätten dafür verantwortlich sind. Nach der Wiedervereinigung 1990 und damit einer Angleichung der Lebensbedingungen im Osten an die des Westens kam es zu einem Anstieg der Prävalenzen unter Kindern, die nach 1990 in Ostdeutschland geboren worden waren ^{60,166}. Die Populationen unterschieden sich interessanterweise jedoch noch 12 Jahre nach der Wiedervereinigung noch bezüglich ihrer T-Helfer-Zell-Antwort. Während atopische und nicht atopische Individuen, die in Ostdeutschland aufgewachsen waren, vor allem TH0-Antworten ausbildeten (>60%), konnte bei westdeutschen Kindern eine TH2-Polarisierung beobachtet werden, vor allem wenn sie atopisch waren ¹²⁹.

Es liegen jedoch auch Ergebnisse vor, die in scheinbarem Gegensatz zu Strachans These stehen: Unter afroamerikanischen und hispanisch-amerikanischen Stadtkindern in den USA konnten hohe Asthmaprävalenzen nachgewiesen werden, obwohl die Lebensbedingungen dieser Bevölkerungsgruppen neben einem geringen Einkommen und erheblichem Zigaretten- und Drogenkonsum der Eltern durch schlechte hygienische

Verhältnisse gekennzeichnet sind ¹⁶⁴. Außer bestimmten hygienischen Bedingungen spielen also vermutlich auch andere Faktoren eine Rolle bei der Entwicklung von allergischen Erkrankungen.

Neben Infektionen des Respirationstraktes könnten auch solche des Gastrointestinaltraktes einen Schutz bieten vor Atopie und Asthma. Es konnte gezeigt werden, dass Individuen mit einer positiven Serologie für Hepatitis A, *Helicobacter pylori* oder *Toxoplasma gondii* weniger häufig unter atopischen Krankheiten leiden ¹⁰².

Nicht nur humanpathogene Bakterien, sondern auch die symbiotische saprophytäre Mikroflora sowie probiotische Bakterien des Gastrointestinaltraktes werden mit einer reduzierten Prävalenz von allergischen Krankheiten in Verbindung gebracht. Eine prospektive Studie, die Bjorksten et al. 2001 unter Neugeborenen in Schweden und Estland durchführten, fand signifikante Assoziationen zwischen der Darmkolonisation mit bestimmten Bakterien während des ersten Lebensjahres und der Entwicklung von atopischer Dermatitis oder allergischer Sensibilisierung. Kinder, die eine atopische Krankheit entwickelten, waren weniger häufig kolonisiert mit *Enterokokken* und *Bifidobakterien* und dafür häufiger mit *Staphylokokken* und *Clostridien* ⁷⁵. Veränderungen der mikrobiellen Darmflora könnten also Veränderungen der Prävalenz von Atopie bedingen. Dieses führte zu der Idee, dass man mikrobiotische Komponenten für die Prävention von Allergien benutzen könnte. Erste viel versprechende Ergebnisse liegen bereits vor ^{77,83}. Der protektive Effekt eines niedrigeren Hygienelevels scheint also nicht nur auf vermehrte Infektionen zurückzuführen sein, sondern auch auf die vermehrte Exposition gegenüber apathogenen mikrobiellen Komponenten in der Umgebung eines Kindes. Diese Idee wurde unterstützt durch die Entdeckung, dass Personen, die mit *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) geimpft worden waren, ein reduziertes Risiko für die Entwicklung allergischer Beschwerden hatten. In einer Studie unter japanischen Schulkindern wurden signifikante Assoziationen gefunden zwischen einer starken Tuberkulin-Antwort und niedrigen IgE-Level, T-Zell-Antworten, die TH1 dominiert waren, und reduzierten Prävalenzen von allergischen Erkrankungen. Vor allem bei Kindern, die in der ersten Woche ihres Lebens geimpft worden waren, war dieser Effekt ausgeprägt. Neben der Impfung schien auch eine natürliche Exposition gegenüber Mykobakterien einen protektiven Effekt zu haben ¹. Die ISAAC-Studie stellte fest, dass ein Anstieg der Tuberkulose-Melde-Rate mit einem Abfall der Häufigkeit von Giemen verbunden war. Eine Studie, an der nur Kinder mit positiver

atopischer Familienanamnese teilnahmen, konnte jedoch keinen Zusammenhang zwischen BCG-Impfung und Atopie feststellen⁷.

Andere Lifestyle-Faktoren, wie z.B. das Halten von Haustieren, sind ebenfalls mit einer niedrigeren Prävalenz von allergischen Erkrankungen assoziiert. Einige prospektive Kohortenstudien stellten ein niedrigeres Risiko für atopische Krankheiten unter Kindern fest, die täglichen Kontakt zu Hunden oder Katze hatten⁶¹.

1.7. Bauerneffekt

Ein weiterer beobachteter protektiver Aspekt, der die Aussagen der Hygienehypothese bekräftigt, ist der so genannte Bauerneffekt.

1989-1990 wurde in einer ländlichen Region Oberbayerns die Münchner Asthma- und Allergie-Studie durchgeführt. Von Mutius et al. fanden heraus, dass Kinder von Familien, die mit Holz oder Kohle heizten, ein signifikant niedrigeres Risiko aufwiesen, an Heuschnupfen, allergischer Sensibilisierung und bronchialer Hyperreaktivität zu erkranken¹⁵⁹. Überlegungen zu den Ergebnissen ergaben, dass die Art des Heizens stellvertretend für einen traditionellen Lebensstil zu sehen war, der damit einen wichtigen schützenden Einfluss auf die Entstehung von allergischen Erkrankungen zu haben schien.

1999 kamen Braun-Fahrlander et al. nach Untersuchungen in der SCARPOL-Studie zu dem Ergebnis, dass Bauernkinder weniger unter Allergien leiden als ihre Altersgenossen²⁴. Diese Entdeckung wurde inzwischen von zahlreichen Studien weltweit bestätigt. Der protektive Effekt des Bauernhoflebens scheint sich dabei stärker auf die Entstehung von atopischer Sensibilisierung und allergischer Rhinitis als auf die Entwicklung von Asthma und anderen atopischen Krankheiten auszuwirken^{70,127,130,131,158}.

Ob der protektive Effekt des Bauernhoflebens bis ins Erwachsenenalter anhält, ist noch nicht abschließend geklärt. Die Studienlage hierzu ist kontrovers. Einige Untersuchungen ergaben, dass erwachsene Bauern ein gesteigertes Risiko für respiratorische Krankheiten haben^{16,157}. Andere Studien wiederum konnten ein Anhalten des protektiven Effektes bis ins Erwachsenenalter feststellen^{79,88}. Diese Ergebnisse könnten jedoch auch auf den so genannten „healthy worker effect“ zurückzuführen sein, der darauf beruht, dass sich Bauern, die allergische oder asthmatische Symptome entwickeln, selbst selektieren, indem sie sich eine neue Beschäftigung suchen⁴⁶.

Bauernkinder unterschieden sich in vielen Studien von Nicht-Bauernkindern auch im Bezug auf verschiedene andere Risikofaktoren. Sie hatten häufig mehr Geschwister^{14,78}, waren zu Hause weniger Tabakrauch ausgesetzt^{19,111,176} und hatten häufiger Haustiere

als Nicht-Bauernkinder ^{78,111}. Diese Faktoren konnten jedoch, neben anderen bereits bekannten Einflussgrößen, wie Grad der elterlichen Schulbildung und familiärer Prädisposition, die enormen Unterschiede zwischen Bauern- und Nicht-Bauernkindern alleine nicht erklären. Nach entsprechender Adjustierung blieben die Assoziationen bestehen ^{24,49,131}. Andere Determinanten scheinen hier eine Rolle zu spielen. Was aber machte den vermuteten protektiven Effekt des Bauernhoflebens aus?

Das Aufwachsen auf einem Bauernhof ist gekennzeichnet durch vielfältige landwirtschaftliche Expositionen, wie Getreidestaub, Sojabohnenstaub, Pestizide, Vieh und schließlich mikrobielle Komponenten wie Endotoxinen und zoonotische Pathogene ⁶⁹. Die Beobachtung, dass auch Nicht-Bauernkinder niedrigere Sensibilisierungsraten aufwiesen, wenn sie häufigen Kontakt zu Stalltieren hatten ¹³¹, sowie die Tatsache, dass der größte allerge-protektive Effekt auf Bauernhöfen beobachtet wurde, zu denen Viehställe gehörten ^{79,158}, sowie teilweise gar nicht nachzuweisen war auf Bauernhöfen ohne Viehzucht ⁴⁵, ließ vermuten, dass der protektive Effekt in Verbindung steht mit Komponenten aus Tierställen.

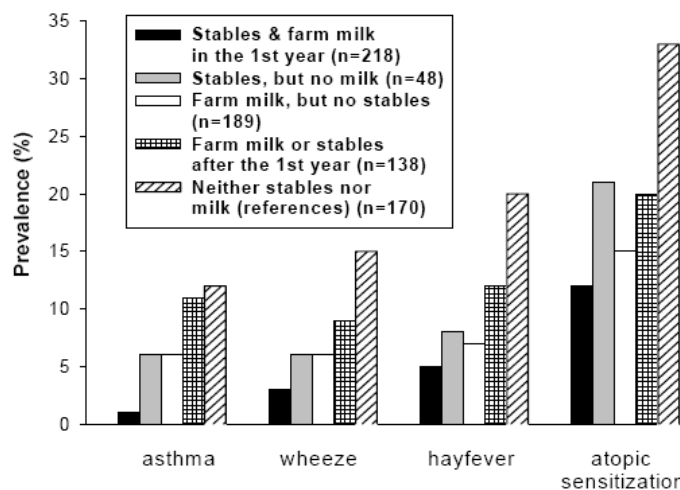


Abbildung 1.6.: Auswirkungen von Stallkontakt und Konsum von Bauernmilch; nach Riedler et al. 2001 ¹³⁰

Eine Komponente, die in Tierställen in hohen Konzentrationen zu finden ist, ist Endotoxin. Auch in den Matratzen von Bauernkindern sowie in denen von Nicht-Bauernkindern mit regelmäßigem Stallkontakt lassen sich höhere Endotoxinkonzentrationen messen als bei Nicht-Bauernfamilien ¹³⁰. Endotoxine sind Bestandteile der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien mit bekannten

immunstimulatorischen Fähigkeiten. Aufgereinigt wird Endotoxin als Lipopolysaccharid (LPS) bezeichnet. Auch Bakterien-Fragmente enthalten LPS, das immer noch biologisch aktiv ist ^{56,142}. Es konnte ein Zusammenhang nachgewiesen werden zwischen hohen Endotoxinkonzentrationen und niedrigeren Prävalenzen von allergischen Erkrankungen ¹²², der auch von der ALlergy and EndotoXin study (ALEX-Studie), einer Querschnittsstudie, die mehr als 800 Kinder in traditionellen alpinen Bauern-Gegenden in Deutschland, Österreich und der Schweiz untersuchte, bestätigt werden konnte ¹³⁰. Die Endotoxinkonzentrationen alleine konnten innerhalb der ALEX-Studie jedoch nicht den protektiven Effekt des Bauernhoflebens erklären und könnten ein Surrogat-Marker sein. Andere Komponenten aus Tierdung, Futter, Staub usw. könnten ebenfalls ausschlaggebend sein für den Effekt.

Neben LPS sind inzwischen für viele weitere mikrobielle Komponenten allergieprotektive Effekte nachgewiesen worden. Dazu gehören CpG-Oligonukleotide ¹³, Lipoproteine und Lipoglykane ¹⁴⁰, Zymodan, Peptidoglykane wie Muraminsäure und MALP-2 ¹⁶⁵. Im Staub von Bauernhäusern wurden hohe Konzentrationen an Muraminsäure gefunden ¹⁵⁵. Muraminsäure ist eine Komponente der Peptidoglykane in der Zellwand aller Bakterien. Bakterielle DNA, die ebenfalls in großen Mengen im Staub von Bauernhäusern nachgewiesen werden konnte, ist reich an hypomethylierten CpG-Abschnitten und könnte möglicherweise das Immunsystem der Bauern triggern und damit einen antiallergischen Effekt haben ¹³⁶. Sogar eine bereits entstandene eosinophile Entzündungsreaktion bildete sich im Kombination mit experimentellen Allergenen zurück unter Einfluss von CpG DNA ¹³.

Der Dung der Stalltiere enthält viele verschiedene Bakterien. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die aus Dung von Kühen isolierten Bakterienstämme *Acinetobacter lwoffii* und *Lactococcus lactis* in der Lage sind eine allergische Reaktion zu reduzieren und ein TH1-polarisierendes Programm in Dendritischen Zellen zu induzieren ³⁹.

Neben der Inhalation, könnte auch der oralen Aufnahme mikrobieller Komponenten eine schützende Rolle zukommen. Für diese Vermutung spricht der protektive Effekt von unpasteurisierter Milch, wie sie oft innerhalb der Bauernfamilien konsumiert wird ¹²⁷.

1.7.1. Potentielle molekulare Mechanismen des Bauerneffektes

Die immunologischen Mechanismen, die dem präventiven Effekt des Bauernhoflebens zu Grunde liegen könnten, sind Gegenstand derzeitiger Forschungen und Diskussionen. Wahrscheinlich erscheint, dass bestimmte Umweltfaktoren, denen Kinder in den ersten Lebensjahren ausgesetzt sind, mit dem spezifischen Genotyp des Kindes interagieren und die Entwicklung des Immunsystems in einer Richtung beeinflussen, welches die Kinder entweder schützt oder prädisponiert für die Entwicklung von allergischen Erkrankungen⁶⁴. Solche Umweltfaktoren stellen nach Anlehnung an die klassische Hygienehypothese pathogene sowie nach Erweiterung dieser These auch nicht pathogene mikrobielle Komponenten dar.

Wie beschrieben sind Allergien TH2-vermittelte Erkrankungen. Die Hygienehypothese wurde oft in Verbindung gebracht mit einer Verschiebung der so genannte TH1/TH2-Balance (siehe oben) in Richtung TH1-Antwort¹⁰¹. Inzwischen existieren jedoch Ergebnisse, die vermuten lassen, dass sich die Effekte der Hygienehypothese nicht alleine durch eine gestörte TH1/TH2-Balance erklären lassen. Nicht nur die Prävalenz TH2-vermittelter Erkrankungen wie Allergien, sondern auch TH1-vermittelter wie Multiple Sklerose und Morbus Crohn hat in den letzten Jahrzehnten zugenommen (siehe Abb. 1.5.)¹². Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Veränderungen unserer Umwelt die Regulation des Immunsystems umfassender beeinflussen. In-vitro Studien zeigen, dass die Stimulation peripherer Lymphozyten von Bauernkindern mit LPS sowohl eine Herunterregulierung der TH2- als auch der TH1-Zytokine bewirkt¹¹⁵.

In diesem Zusammenhang wird die Rolle von Tregs diskutiert. Tregs haben eine immunsuppressive Wirkung auf TH1- und TH2-Zellen, indem sie inhibitorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β sezernieren und auf ihrer Oberfläche negativ kostimulatorische Moleküle wie CTLA4 und CITR (Glucocorticoid-Induced TNF Receptor) exprimieren¹¹⁵. Von besonderem Interesse sind derzeit die CD4+CD25+T-Zellen, die bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten in reduzierter Anzahl vorliegen²⁰. Ein möglicher Grund für die Entwicklung von allergischen Erkrankungen könnte ein Fehlen oder eine Verminderung der Treg-vermittelten Suppression der TH2-Aktivität sein, wie es beispielsweise bei einer Veränderung des spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 zu beobachten ist. Entwicklung und Funktion der

CD4+CD25+ Zellen hängen hauptsächlich von der Expression des spezifischen Transkriptions-Faktors Foxp3 ab. Eine Deletion im Gen von Foxp3 resultiert in einem Fehlen der Suppressor-Aktivität der CD4+CD25+T-Zellen^{144,173}. Eine Studie konnte zeigen, dass CD4+CD25+Zellen von atopischen Spendern eine reduzierte Fähigkeit hatten die Proliferation und TH2-Zytokinproduktion von autolog allergen-stimulierten CD4+CD25-Zellen zu supprimieren im Gegensatz zu CD4+CD25+ Zellen von nicht atopischen Spendern⁹⁰.

Tregs können aktiviert werden durch natürliche Allergenexposition, und zwar dosisabhängig. Relativ hohe Allergenlevel in der Luft führen zu allergenspezifischer IgG-Produktion ohne eine IgE-Produktion zu bewirken. In murinen Modellen konnte gezeigt werden, dass geringe Antigendosen maximale IL-4-Sekretion und damit IgE-Level nach sich ziehen, während gesteigerte Allergenkonzentrationen zu einer Suppression der IL-4-Produktion und dafür vermehrter IFN- γ -Sekretion führen⁷². Auch nachdem sich eine TH2-Antwort schon etabliert hat, können hohe Proteinlevel noch eine Veränderung der TH1/TH2-Balance bewirken⁷⁶, eine Tatsache, die man sich bei der allergenspezifischen Immunotherapie des Heuschnupfens zu Nutzen machen kann. Das Leben auf dem Bauernhof geht einher mit hohen Allergenkonzentrationen und könnte auf diesem Weg seine protektive Wirkung entfalten. Auch LPS, das in hohen Konzentrationen in Ställen gefunden werden kann, kann Tregs stimulieren (über TLR4). Diese Stimulation kann die Expression bestimmter Oberflächenmarker auf Tregs induzieren, die Überlebenszeit der Tregs verlängern sowie die Suppressorfunktion dieser Zellen fördern²⁹. Gesteigerte TH2-Aktivität und damit verbundene allergische Reaktionen könnten also auf eine fehlende Verschiebung in Richtung TH1-getriggelter Immunantwort, eine gestörte Suppression durch Tregs oder beides zusammen zurückzuführen sein¹³³.

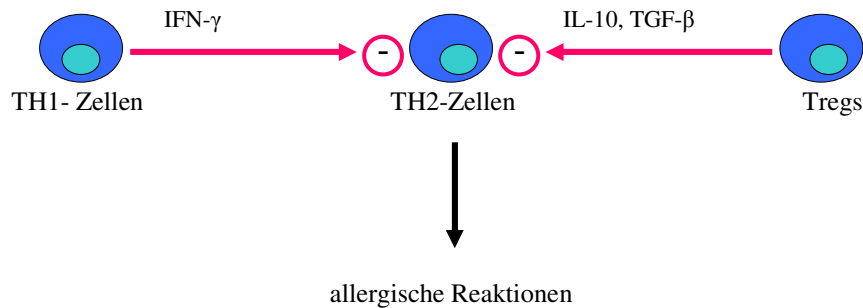


Abbildung 1.7.: Kontrolle der TH2-Zellen durch Tregs und TH1-Zellen

1.7.2. Bedeutung des Expositionszeitpunktes

Vielfältige Faktoren, wie die Familiengröße, die intestinale Flora, das Aufwachsen auf dem Bauernhof, das verbunden ist mit Stallkontakt und dem Konsum von nicht pasteurisierter Milch sowie das Besitzen von Haustieren, können wie erläutert protektiv wirken bezüglich der Entwicklung von atopischen Erkrankungen. Damit diese Expositionen jedoch den beschriebenen präventiven Effekt haben, müssen sie zu einem bestimmten Zeitpunkt und mit einer gewissen Häufigkeit auftreten und zwar während des ersten Lebensjahres oder sogar schon intrauterin. Expositionen, denen die Kinder in älteren Lebensjahren ausgesetzt sind, bieten entweder keinen oder nur schwächeren Schutz oder führen sogar umgekehrt zu akuten Exazerbationen respiratorischer Symptome^{47,130}.

Riedler et al. zeigten, dass Kinder, die, bevor sie ein Jahr alt waren, einer bäuerlichen Umgebung und unpasteurisierter Bauernmilch ausgesetzt waren, weniger häufig unter Asthma (1% vs.. 11%), Heuschnupfen (3% vs.. 13%) und atopischer Sensibilisierung (12% vs.. 29%) litten, im Vergleich zu Kindern, die im Alter von 1-5 Jahren unter dieser Exposition standen. Am seltensten erkrankten Kinder, die von Geburt an kontinuierlich bis zum Alter von 5 Jahren Stallkontakt hatten¹³⁰. Braun-Fahrlander et al. wiesen nach, dass Kinder von Vollzeit-Bauern niedrigere IgE-Serum-Spiegel hatten als

Kinder von Halbzeit-Bauern. Diese Beobachtung lässt einen dosisabhängige Beziehung zwischen Expositionen des bäuerlichen Lebens und atopischer Sensibilisierung vermuten²⁴.

Interessanterweise zeigen die Ergebnisse der ALEX-Studie auch auf, dass die Entwicklung von bronchialem Asthma signifikant geringer war unter Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft weiterhin im Stall gearbeitet und unpasteurisierte Milch getrunken hatten¹³⁰. Neben der Stallexposition in den ersten Lebensjahren, scheint also auch oder vor allem eine pränatale Exposition einen starken Schutz zu bieten. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es ein spezifisches Zeitfenster gibt, das sich schon intrauterin empfindlich zeigt bezüglich bestimmter Umweltbedingungen, die das kindliche Immunsystem in Richtung Allergie oder im Sinne eines Schutzes vor der Entwicklung von Allergien beeinflussen können. Dieses genauer zu definieren und weitere Erkenntnisse bezüglich der verantwortlichen Mechanismen zu erlangen sind Ziele dieser Arbeit.

1.8. Die PASTURE-Studie

Die experimentellen Untersuchungen und Ausarbeitungen dieser Arbeit erfolgten im Rahmen eines internationalen Projektes, der so genannten PASTURE-Studie¹⁶⁰. Die PASTURE-Studie ist eine prospektive Studie, die in ländlichen Umgebungen Europas durchgeführt wird. Ziel der PASTURE-Studie ist es, genauer zu definieren, welche Rolle die Exposition durch verschiedene mikrobielle Komponenten bei der Entwicklung von Asthma und Allergien im Kindesalter spielt. Vor allem die immunologischen und genetischen Mechanismen, die beteiligt sind an der individuellen Antwort auf diese Umwelteinflüsse, sollen näher untersucht werden. Erstmals wird der Zusammenhang zwischen Allergien, ihren Risikofaktoren und bestimmten Einfluss nehmenden Umweltfaktoren prospektiv verfolgt.

Im Rahmen dieser Studie werden neben IgE-Bestimmungen, DNA- und mRNA-Analysen, Kuhmilch- und Muttermilchproben, Staubsammlungen und Befragungen bezüglich der Ernährungsgewohnheiten, Stallkontakten und mütterlicher Allergie-Anamnese auch eine Bestimmung der Zytokinprofile neugeborener und im weiteren Verlauf auch einjähriger Bauern- und Nicht-Bauernkindern vorgenommen.

1.9. Zielsetzung und Fragestellung

1.9.1. Zielsetzung

Wie beschrieben können bestimmte Umweltfaktoren, die mit dem Leben auf dem Bauernhof assoziiert sind, Auswirkungen auf die Entwicklung des Immunsystems im Sinne allergieprotektiver Effekte haben. Ergebnisse epidemiologischer Studien, wie der PARSIFAL-Studie ⁴⁷ sowie einer finnische Kohortenstudie ¹³⁵, deuten darauf hin, dass dieser Schutz nicht nur postpartal vermittelt wird, sondern auch schon intrauterin angelegt wird.

Wenn dies der Fall ist, sollten sich schon bei den neugeborenen Bauernkindern Unterschiede bezüglich des Immunstatus finden lassen, vor allem im Hinblick auf Marker der TH1/TH2-Balance, den Zytokinen. Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob solche Ungleichheiten bestehen und wie diese charakterisiert sind.

Dazu werden die Konzentrationen folgender Zytokine in Nabelschnur-Vollblutproben neugeborener Kinder aus Bauern- und Nicht-Bauernumfeld nach mitogener Stimulation bestimmt: IL-5 (spiegelt TH2-Immunität wider), IL-10 (spiegelt Treg-Aktivität wider), IFN- γ (spiegelt TH1-Immunität wider) sowie IL-12 und TNF- α (reflektieren Aktivität des angeborenen Immunsystems). Diese Zytokine liefern Hinweise auf den Effektorstatus der neonatalen T-Zellen. So kann zumindest teilweise zwischen TH1-, TH2- und Treg- Antworten unterschieden werden.

Die Zytokinwerte sollen assoziiert werden mit bestimmten demographischen Faktoren sowie typischen Expositionen des bäuerlichen Lebens, um genauer zu definieren, welche Umweltexpositionen im Einzelnen Einfluss nehmen auf die Zytokinmuster. Die hergestellten Assoziationen innerhalb der Gesamtpopulation der PASTURE-Studie sollen des Weiteren verglichen werden mit den Ergebnissen der Teilstudienpopulation Österreich, um länderspezifische Unterschiede hinsichtlich Expositionen und Zytokinwerten innerhalb der PASTURE-Population aufzudecken.

Auf diese Weise kann die Reifung des Immunsystems unter verschiedenen Umweltbedingungen (Bauern- Nicht-Bauernumfeld) sowie die Auswirkungen einer

pränatalen Exposition näher untersucht werden und des Weiteren in Assoziation zu der Entwicklung von Allergie und Atopie der Kinder diskutiert werden.

1.9.2. Fragestellung

1. Unterscheiden sich die Zytokinprofile von neugeborenen Bauern- und Nicht-Bauernkindern? Wie sehen diese Unterschiede aus?
2. Welche Effekte haben demographische Faktoren auf die Zytokinexpression der Neugeborenen?
3. Welche Effekte haben pränatale Expositionen des bäuerlichen Lebens auf die Zytokinexpression der Neugeborenen?
4. Unterscheiden sich die Zytokinprofile österreichischer Neugeborener von den Neugeborenen der Gesamtpopulation der PASTURE-Studie hinsichtlich Expositionen und Zytokinwerten?
5. In wie weit könnten gefundene Assoziationen in Zusammenhang gebracht werden mit dem Risiko für die Entwicklung von atopischen Erkrankungen?

2. Material und Methoden

2.1. Materialübersicht: s. Anhang

2.2. Studiendesign: PASTURE

Die hier beschriebenen experimentellen Untersuchungen und Ausarbeitungen erfolgten im Rahmen eines internationalen Projektes, der PASTURE (Protection against Allergy – Study in Rural Environment) Studie. Die Durchführung dieser Studie, sowie die Aufstellung des Studiendesigns, ist unter der Studienleitung von Prof. Dr. Erika von Mutius sowie Dr. med. Susanne Schmidt koordiniert worden.

Die PASTURE-Studie ist eine multizentrische, prospektive Kohortenstudie, die von der Europäischen Union gefördert wird. Sie wird in ländlichen Regionen Europas durchgeführt. Dazu gehören neben Österreich (Salzburg) und Deutschland (München) auch Schweiz (Basel) und Finnland (Kuopio). Außerdem schloss sich Frankreich (Besancon) als fünfte Gruppe dem Projekt an, allerdings mit separierter Finanzierung.



Abbildung 2.1.: Studienzentren PASTURE

Die Studienteilnehmer sollen bis zum Alter von sechs Jahren begleitet werden ¹⁶⁰. Ziel der PASTURE-Studie ist es zu klären, ob und welche Expositionen durch verschiedene mikrobielle Komponenten protektiv auf die Entwicklung von Asthma und Allergien im Kindesalter wirken. Dabei wird sowohl auf immunologischer als auch auf genetischer Ebene untersucht, wie diese für das traditionelle bäuerliche Milieu typischen Expositionen die individuelle Antwort verändern können.

Dazu werden im Rahmen dieses Projektes

- Laborparameter aus Probenmaterial von Probanden bestimmt, die eine Allergophänotypisierung der Kinder zu bestimmten Altersphasen erlauben
- Regelmäßige anamnestische Untersuchungen zur Determinierung des allgemeinen und des Allergiestatus der teilnehmenden Kinder durchgeführt
- Nahrungsmittelanalysen bei farmspezifischen Lebensmitteln wie Milch und Milchprodukten und Staubsammlungen mit anschließender Analyse auf mikrobielle Komponenten durchgeführt
- Befragungen bezüglich der Ernährungsgewohnheiten, zu Stallkontakten und zu mütterlicher Allergie-Anamnese anhand von Fragebögen vorgenommen

Gegenstand dieser Arbeit ist die Bestimmung und Diskussion des T-Zell-Effektorstatus neugeborener Bauern- und Nicht-Bauernkinder anhand einer Analyse der Zytokinprofile aus Nabelschnur-Vollblutproben (IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α). Insbesondere soll die Studienteilpopulation Österreich im Vergleich zur PASTURE-Gesamtpopulation betrachtet werden.

2.3. Studienzentrum Österreich

Die Studienteilnehmer der österreichischen Subpopulation leben im Nordwesten Österreichs. Zur Studienregion gehören die Bezirke Braunau, Flachgau, Tennengau und Pongau. Die Flächen dieser Bezirke erstrecken sich über das Voralpenland, die Voralpen und die Hochalpen. In dieser Region leben 360000 Einwohner in Höhen zwischen 300m und 1000m. Insgesamt 11000 Bauernhöfe liegen im Studiengebiet. Die meisten Bauern betreiben Ackerbau und Viehzucht. Ein weiterer wichtiger Wirtschaftszweig für die Region um Salzburg stellt der Tourismus dar.

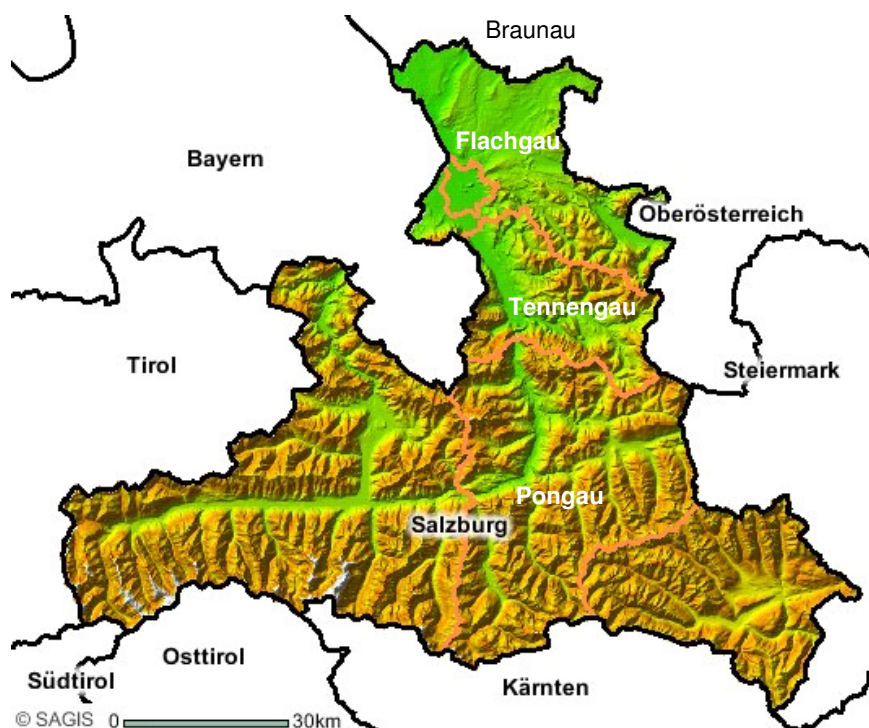


Abbildung 2.2.: Übersichtskarte Land Salzburg, Österreich

Quelle: <http://www.salzburg.gv.at/landkarten>

2.4. Studienpopulation

Im Zeitraum zwischen August 2002 und März 2005 wurden schwangere Frauen im dritten Trimester identifiziert.

In Österreich wurde die schwangeren Frauen in der ländlichen Umgebung Salzburgs kontaktiert, indem Studienangestellte Geburtsvorbereitungskurse besuchten. Berichte in regionalen Zeitungen, Fernsehen und Radio machten das Projekt unter der ländlichen Bevölkerung bekannt. Nach dem Ausfüllen eines Fragebogens wurden die Frauen, die für die Studie in Frage kamen, telefonisch kontaktiert.

Die rekrutierten Personen wurden in zwei Kohorten eingeteilt: Einer Bauernkohorte und einer Referenzgruppe (Nicht-Bauernkohorte).

Kriterien der Bauernkohorte:

- Zum Zeitpunkt der Erfassung lebt die Frau mit ihrer Familie auf einem Bauernhof mit Viehzucht
- Vollzeit- oder Teilzeitbauern, aber auch Familien, die auf einem Bauernhof wohnen ohne an der Hofarbeit beteiligt zu sein

Kriterien der Nicht-Bauernkohorte:

- Familien leben in der gleichen Gegend wie die Bauernfamilien
- Schwangere werden an der gleichen Klinik rekrutiert, keine städtischen Kliniken
- Familien, die vor Geburt des Kindes von einem Bauernhof wegziehen
- Heimatstadt der Frauen hat weniger als 30000 Einwohner und keine Schwerindustrie

Bauernfamilien, die auf einem Hof leben, an dem kein Vieh gehalten wird, werden weder der Bauern- noch der Nicht-Bauernkohorte zugeteilt.

Ausschlusskriterien:

- Frauen unter 18 Jahren
- Zwillingschwangerschaft
- Geschwister des Kindes sind bereits Studienteilnehmer
- Frauen, die eine Hausgeburt planen

- Familien, die planen aus dem Studiengebiet wegzuziehen
- Familien ohne Telefonverbindung
- Familien, die nur unzureichende Sprachkenntnisse haben
- Frühgeburt (Geburt vor der 37. SSW)
- Ernsthafte genetische Defekte (wie Down-Syndrom)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 625 Blutproben von neugeborenen Kindern aus Bauern- oder Nicht-Bauern-Umfeld untersucht, darunter 105 Proben österreichischer Kinder.

2.5. Qualitätskontrolle

Reproduzierbarkeit und Variabilität der labortechnischen sowie „fieldwork“ –Verfahren sind nach vorheriger Standardisierung in detaillierten „Standard Operating Procedures“ (SOP) bestimmt worden. Die Blutproben sind von allen Medizinisch Technischen Assistenten unter den gleichen Bedingungen gesammelt und stimuliert worden. Die Ergebnisse wurden verglichen zwischen den einzelnen MTAs und zwischen den einzelnen Zentren. Die Fragebogendaten sind auf Vollständigkeit und Plausibilität hin untersucht worden und zentral und standardisiert ausgewertet worden.

2.6. Probenanalyse mittels ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Probenvorbereitung

An den teilnehmenden Instituten wurden die Blutproben der Neugeborenen (Li-Heparin-Blut) bei Geburt durch die Hebammen aus der Nabelschnur abgenommen und anschließend bei einer Transporttemperatur von 4 °C in die lokalen Studienzentren gebracht. Von den Eltern der Kinder wurden Einverständniserklärungen für die Stimulation der Nabelschnurblutzellen und die anschließende Zytokinanalyse eingeholt. In den Studienzentren wurde das heparinisierte Blut in RPMI Zellkulturmedium angereichert mit 1x Antibiotikum/Antimykotikum (beides Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und mit 10% FCS (PAA, Cölbe, Deutschland) suspendiert (1:8). Innerhalb von 27 Stunden nach Blutentnahme erfolgte anschließend die Stimulation der Blutzellen, wobei jeweils ein Milliliter der suspendierten Blutzellen für 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C in 5% Kohlendioxidatmosphäre inkubiert wurde. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch eines der folgenden Mitogene:

1. Kombination aus Phorbol Myristate Acetate (PMA) (5 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml) (P/I) (beides von Sima, Deisenhofen, Deutschland)
2. Lipopolysaccharid (LPS) (0,1 µg/ml) (bereitgestellt von Prof. Holst und Prof. Brade, Borstel)
3. Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB) (0,1 µg/ml) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

PMA wirkt intrazellulär stimulierend auf den Aktivierungsstatus von T-Zellen. Diese Stimulation ist antigenunspezifisch. **Ionomycin** wirkt als Ionophor, indem es PMA in die Zelle einschleust. Die Kombination aus PMA und Ionomycin (P/I) ist ein klassischer Stimulator von T-Zellen. Jede lebende T-Zelle muss auf diese Art der Aktivierung antworten, unabhängig von der Anwesenheit anderer, z.B. inhibitorischer Zellen. Aus diesem Grund reflektiert die P/I-Stimulierung den aktuellen Status der T-Zell-Effektor-Funktion.

LPS wurde ausgewählt, da es ein wichtiges Toxin repräsentiert, das von gramnegativen Bakterien gebildet wird. Dieses Mitogen ist ein polyklonaler Aktivator von B-Zellen, die unabhängig von ihrer Antigenspezifität aktiviert werden, proliferieren und sich zu

Plasmazellen differenzieren. LPS bindet an ein LPS bindendes Protein und an CD14. Über diese Bindung kommt es zur Aktivierung des TLR4 an der Oberfläche von B-Zellen, welches eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B nach sich zieht. Die auf diesem Weg weitergeleiteten Signale induzieren die Expression von B7-Molekülen und proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α .

SEB ist ein Superantigen, das von *Staphylococcus aureus* gebildet wird. Superantigene sind die potentesten T-Zell-Mitogene. Sie verknüpfen den MHC II einer APC und den T-Zell-Rezeptor einer T-Helfer-Zelle. Diese Bindung erfolgt antigenunabhängig und resultiert in einer gesteigerten Zytokinproduktion der T-Zellen. Somit wurden zwei verschiedene bakterielle Stimuli eingesetzt, die in hohen Konzentrationen auf den Bauernhöfen gefunden worden waren. Die Stimulantien sind vorher in Pilot-Experimenten getestet worden betreffend ihrer Kapazität eine Zytokin-Produktion von Nabelschnurblutzellen zu induzieren. Nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen in 1,5 ml cups pipettiert und für 10 Minuten zentrifugiert (800g). Die zellfreien Kulturüberstände wurden abpipettiert und bei -80°C tief gefroren. In diesem Zustand wurden sie auf Trockeneis weitergeleitet an das Biomedizinische Forschungszentrum des Instituts für Klinische Chemie und Molekularer Diagnostik der Philipps Universität Marburg zur Zytokinkonzentrationsmessung.

Die tief gefrorenen, aliquotierten Kulturüberstände wurden hier erneut in drei Portionen zu jeweils 200 μ l aliquotiert, um eine Reserve für eventuelle Nachmessungen zu haben. Anschließend wurden die Aliquots zu jeweils 200 μ l in 1,5 ml Eppendorf Tubes in beschrifteten Sortierkartons bei -70°C eingefroren. Um den Verlust an Zytokinen, der erfahrungsgemäß beim Einfrieren und Auftauen von Kulturüberständen auftreten kann, möglichst gering zu halten, ist darauf geachtet worden alle Arbeitsschritte stets auf Eis und zügig durchzuführen. Die Proben wurden bei 4°C im Kühlschrank über Nacht aufgetaut (13h).

Assaydurchführung

Mit der Hilfe einer standardisierten ELISA-Methode wurden die Zytokinkonzentrationen der stimulierten Proben bestimmt. Dazu wurden ELISA OptEIA™ -Kits für humanes IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α benutzt und die Anweisungen des Herstellers befolgt (Opteia ELISA kit, BD, Heidelberg, Deutschland). Im jeweiligen Kit enthaltene zytokinspezifische Fangantikörper (Capture-Antibody) wurden nach Anleitung mit PBS-Puffer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) verdünnt (IL-5: 1:1000; IL-10: 1:1000, IL-12: 1:250; IFN- γ : 1:1000; TNF- α : 1:500) und damit 384-Well-Platten (Nunc-GmbH Wiesbaden, Deutschland) mit jeweils 50 μ l pro Kavität beschichtet. Über Nacht (15h) wurden die Platten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit Hilfe des TECAN-Washers mit Waschpuffer (PBS+0,1% Tween 20 (Sigma Biochemica, Deisenhofen)) wurden die Platten auf saugfähigem Papier ausgeschlagen. Dieses geschah nach jedem der im Folgenden beschriebenen Waschschritte ebenfalls. Zum Abblocken überschüssiger Capture-Antikörper wurde auf jede der Platten PBS+10% endotoxinfreies Fetal Calf Serum (FCS) (Gold, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) mit 50 μ l pro Kavität pipettiert und die Platten anschließend für eine Stunde auf dem Rütteltisch mit 350 rpm in feuchter Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Auswaschen der Platten wurden die Verdünnungsreihe des mitgelieferten Standards laut Anleitung des Zytokin-Kits sowie die Proben mit 50 μ l pro Kavität aufgetragen und für weitere zwei Stunden in der feuchten Kammer auf dem Rütteltisch bei Raumtemperatur mit 350 rpm inkubiert. Zur Verdünnung einer Standardreihe wurde PBS+10% FCS benutzt. Der Ausgangsstandard betrug für die Zytokine IL-5, IL-10 und IL-12 500 pg/ml, für IFN- γ und TNF- α 1000 pg/ml und wurde mit PBS + 10% FCS sechsfach im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die Verdünnungen der Standardreihe wurden jeweils doppelt auf die Platte pipettiert, um bei der Messung später den Standard in einer Doppelbestimmung festzulegen, was die Genauigkeit der Messung optimiert. Zwei Kavitäten wurden als Bezugsleerwert (Blank) nur mit PBS + 10% FCS beschickt. Die Proben wurden in Einfachbestimmung verarbeitet, dabei wurden die Proben auf alle Platten unverdünnt aufgetragen. Auf die Platten zur Bestimmung von IL-10, IFN- γ und TNF- α wurden die Proben zusätzlich in einer 1:20- sowie in einer 1:50-Verdünnung gegeben, da im Vorversuch die Notwendigkeit dieser Verdünnungen eruiert worden war. Während der Inkubation band das Interleukin an die feststehenden Antikörper auf der Platte, und zwar proportional zu seiner Konzentration. Im Anschluss wurden die Platten

erneut dreimalig ausgewaschen, um unspezifisch gebundene Stoffe zu eliminieren. Der zytokinentsprechende biotinylierte Zweitantikörper (Detection-Antibody) wurde mit einer Enzymreagenz (Avidin-horseradish peroxidase conjugate) und PBS+10% FCS angesetzt und mit jeweils 50 µl pro Kavität auf die Platten pipettiert. Nun wurden die Platten wieder für eine Stunde bei 350 rpm auf dem Rütteltisch bei Zimmertemperatur inkubiert. In dieser Zeit band der Zweitantikörper an die bestehenden Komplexe aus Capture-Antibody und Interleukin. Ein erneutes dreimaliges Waschen eliminierte ungebundene Reste des Konjugates, so dass nun auch das Konjugat proportional zur Ausgangs-Interleukin-Konzentration war. Im letzten Schritt wurde zu allen Kavitäten, einschließlich des Blank, 50 µl POD Substrat (BM Blue, Roche Diagnostics Corporation, Mannheim, Deutschland) gegeben und der Ansatz im Dunkeln für 10 Minuten inkubiert. Das Substrat POD wird durch die Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Durch Zugabe von 50 µl H₂SO₄ wurde diese Reaktion unterbrochen. Bei diesem Schritt musste darauf geachtet werden, dass alle Kavitäten in gleichem Rhythmus behandelt werden, um vergleichbare Zeitfenster zu haben. Die Ausgangskonzentration des Interleukins ist proportional zum gebundenen Zweit-Antikörper und der Enzymreagenz und damit auch zur Farbintensität nach Farbreaktion des Enzyms. Aus diesem Grund konnten die exakten Interleukin-Konzentrationen der Proben nun indirekt über die Messung der Farbintensität mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 450 nm bis 690 nm Referenzwellenlänge und Berechnung anhand der Standards im Bezug zum Blank-Leerwert mit Hilfe einer geeigneten Software (Magellan 5) bestimmt werden. Die Sensitivitäten waren 10 pg/ml für IFN- γ , 7,7 pg/ml für TNF- α , 8 pg/ml für IL-5, 7,2 pg/ml für IL-12 und 11,4 pg/ml für IL-10. Der Variationskoeffizient lag zwischen 1,2% und 5,2% für drei verschiedene Konzentrationen (n=10).

Die Stimulation mit LPS und SEB ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Bauern- und der Nichtbauernpopulation. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse der PMA/Ionomycin-Stimulation für die statistische Auswertung benutzt.

2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch Gisela Büchele, MPH, Universität Ulm, Abteilung für Epidemiologie. Die bestimmten Zytokinwerte (nach PMA/Ionomycin-Stimulation) wurden auf die Leukozytenzahl standardisiert. Um eine hinreichende Annäherung der positiven Werte an Normalverteilung zu erreichen, wurde eine Log-Transformation (base 1, after adding 10) vorgenommen. Um auf Assoziation zwischen den Zytokinleveln und den demographischen Variablen sowie den typischen Bauernhofexpositionen prüfen zu können, wurde das multivariate Tobit-Regressions-Modell (Procedure QLIM in SAS®, SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc 9.1.3., 2006) benutzt. Die Anwendung des Tobit Modells ist sinnvoll für kontinuierliche Variablen mit vielen unter Abrissgrenze liegenden („left censored“) zensierten Werten und ist ein gutes und geeignetes Verfahren diese Werte bei der Kalkulation adäquat zu berücksichtigen. Im Bezug auf die vorausgesetzte Einflussnahme auf die Werte unterhalb der Nachweisgrenze, wendet dieses Modell eine lineare Regression auf eine latent abhängige Variable an, indem die maximale Wahrscheinlichkeit geschätzt wird. Die Auswertung der demographischen Daten erfolgte für bivariate Verteilungen mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests. Für multivariate Verteilungen wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Die Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut wurden durch eine Bivariatanalyse mit verschiedenen Expositionsvariablen (Farmstatus, Aufenthalt der Mutter im Stall während der Schwangerschaft, Aufenthalt der Mutter in Heuschobern während der Schwangerschaft, Kontakt der Mutter zu Stalltieren während der Schwangerschaft und Konsum der Mutter von Bauernmilch während der Schwangerschaft) assoziiert. Signifikante Assoziationen wurden mit Hilfe des Trend-Tests Two-sided Wilcoxon-Test bestimmt. Die "Geometric Means Ratio (GMR)" mit einem Konfidenzintervall von 95% wurde berechnet durch Exponentierung der Koeffizienten und der Grenzen des Konfidenzintervalls. Alle angewendeten Modelle wurden für Studienzentrum und Bauernstatus adjustiert und, wenn notwendig, auch für Geschlecht, mütterliches Rauchen, elterlichen Ausbildungsgrad, Anzahl der älteren Geschwister, mütterliches Alter, mütterliche Asthma-, Heuschnupfen- und Neurodermitisanamnese. Die untersuchten Analysen werden als signifikant betrachtet bei einem p-Wert von 0,05 oder kleiner, p-Werte kleiner als 0,0001 zeigen hochsignifikante Assoziationen an. Ab einem p-Wert von 0,1 liegt eine Borderline-Signifikanz vor.

Alle statistischen Berechnungen wurden durchgeführt mit SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc Cary, NC).

3. Ergebnisse

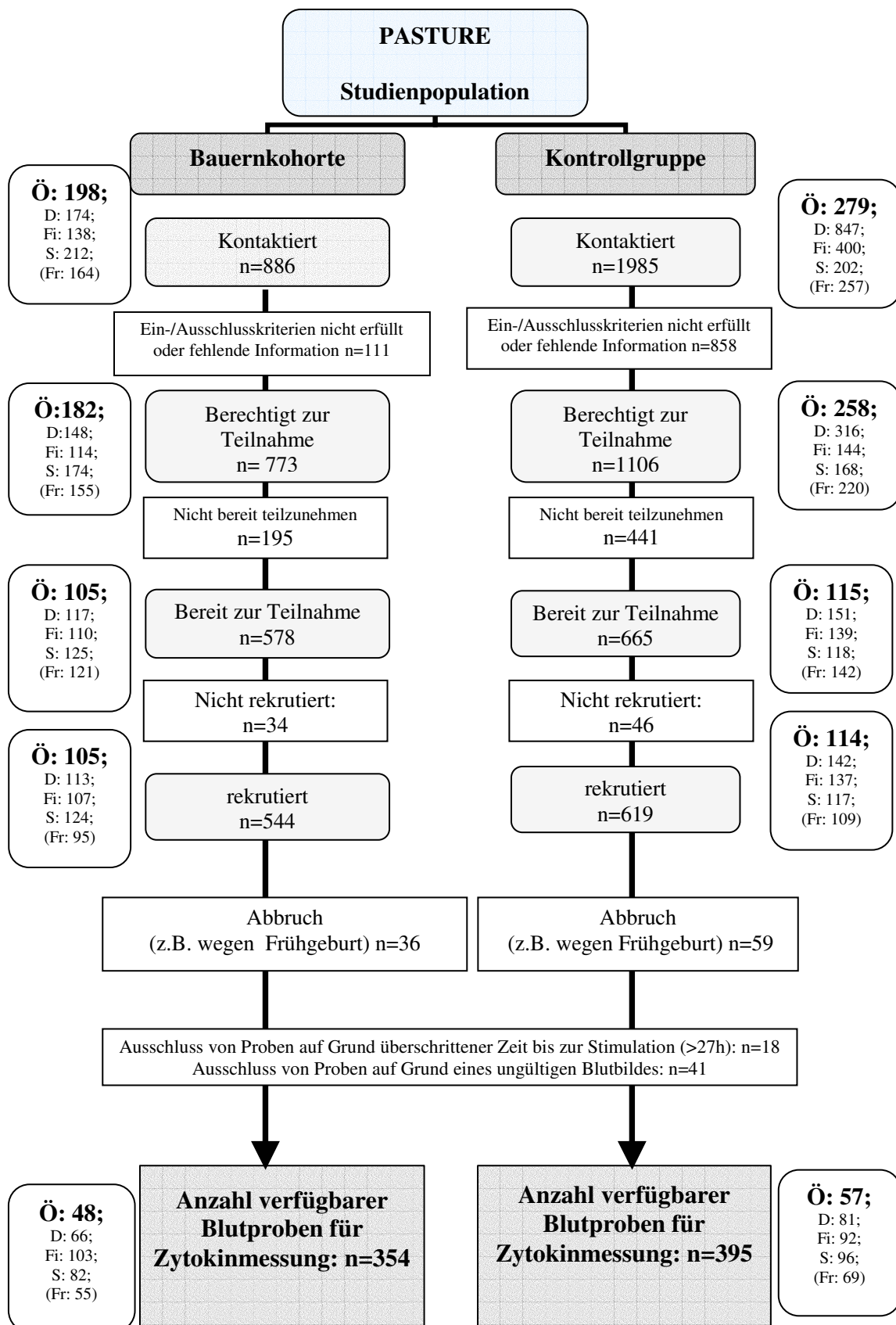
3.1. Studienpopulation

Die Gesamtpopulation der PASTURE-Studie setzt sich aus 625 Familien zusammen, davon wurden 299 Familien (47,8%) der Bauerngruppe und 326 Familien (52,2%) der Kontrollgruppe zugeteilt. Die Gesamtpopulation umfasst Teilnehmer der Studienzentren in Österreich, Schweiz, Deutschland und Finnland. Das Zentrum Frankreich wurde bei der Analyse der Zytokindaten von der statistischen Analyse ausgeschlossen, da zu viele Proben unterhalb der Abrissgrenze lagen (siehe unten).

Tabelle 3.1.: Studienzentren und Kohortenzuteilung

Studienzentrum	Kontrollkohorte	Bauernkohorte	Total
Österreich	57 (54,2%)	48 (45,7%)	105 (100%)
Schweiz	96 (53,9%)	82 (46,0%)	178 (100%)
Deutschland	81 (55,1%)	66 (44,8%)	147 (100%)
Finnland	92 (47,1%)	103 (52,8%)	195 (100%)
Total	326 (52,1%)	299 (47,8%)	625 (100%)

Die Studienteilpopulation Österreich setzt sich aus insgesamt 105 Familien zusammen. Davon wurden 48 Familien (45,7%) der Bauernkohorte zugeteilt und 57 Familien (54,2%) der Kontrollgruppe.



Ö: Österreich, D: Deutschland, Fi: Finnland, S: Schweiz, Fr: Frankreich

Abbildung 3.1.: Studienteilnehmer PASTURE

3.2. Soziodemographische und bauernhofspezifische Charakteristiken

3.2.1. PASTURE-Gesamtpopulation (alle Studienzentren)

Tabelle 3.2. und 3.3. stellen soziodemographische und bauernhoftypische Charakteristiken der PASTURE-Population dar. In den beiden Kohorten zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Geschlechterverteilung. Während für das Alter der Neugeborenen bei Geburt (in abgeschlossenen Schwangerschaftswochen) kein signifikanter Zusammenhang zur Kohortenzugehörigkeit festzustellen ist, liegt das durchschnittliche Geburtsgewicht der Neugeborenen der Bauernkohorte hochsignifikant über dem der Kinder der Kontrollgruppe. Die Mütter beider Kohorten unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihres Alters, jedoch bezüglich ihres BMIs: der durchschnittliche BMI der Bauernmütter liegt über dem der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Bei den Müttern der Bauernkohorte handelt es sich außerdem weniger häufig um Erstgebärende als bei den Müttern der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). Die Bauernkohorte zeichnet sich überdies durch einen hochsignifikant niedrigeren Bildungsgrad der Eltern aus. Elterliches Rauchen sowie Rauchen der Mutter während der Schwangerschaft wird weniger häufig in den Bauernfamilien beobachtet ($p < 0,0001$). Studienteilnehmer der Bauernpopulation weisen seltener eine positive elterliche Asthmaanamnese auf, vor allem bezüglich der väterlichen Anamnese ergeben sich dabei hochsignifikante Unterschiede. Mütter der Bauernkohorte nahmen während der Schwangerschaft deutlich häufiger Bauernmilch zu sich als Schwangere der Kontrollgruppe (73,9% vs. 12,5%; $p < 0,0001$). In beiden Gruppen wurde diese Milch vor allem in ungekochter und nicht entrahmter Form konsumiert. Neben der rohen Kuhmilch wird innerhalb der Bauernfamilien auch vermehrt daraus hergestellte Butter sowie Joghurt konsumiert ($p < 0,0001$). Schwangere der Bauernkohorte verbrachten durchschnittlich mehr Zeit in Tierställen und Heuschobern als Schwangere der Kontrollgruppe ($p < 0,0001$) und hatten hochsignifikant häufiger Kontakt zu Stalltieren (Kühe, Schweine, Geflügel, Schafe und Ziegen).

Tabelle 3.2.: Soziodemographische Faktoren der PASTURE-Gesamtpopulation

	Kontrollen	Bauern	
	(N=326, 52.2%)	(N=299, 47.8%)	p-Wert
Geschlecht des neugeborenen Kindes: Junge (ja/nein)	170 (53.0%)	146 (49.3%)	0.37
Schwangerschaftsalter des Neugeborenen in Wochen (median, min-max)	40 (35-43)	40 (36-43)	0.96
Geburtsgewicht des Neugeborenen in Gramm (median, min-max)	3445 (1990-4850)	3550 (1900-5100)	0.0002
Alter der Mutter in Jahren (median, min- max)	31.0 (19-44)	31.2 (21-48)	0.074
BMI der Mutter in kg/m ² (median, min- max)	22.5 (16-37)	23.6 (18-44)	<0.0001
Elterliches Rauchen (ja/nein)	226 (69.3%)	160 (53.5%)	<0.0001
Mutter rauchte während der SS (ja/nein)	60 (18.4%)	18 (6.0%)	<0.0001
Niedriger Ausbildungsgrad der Eltern (ja/nein)	146 (44.7%)	175 (58.5%)	0.0006
Erstes Kind der Mutter (ja/nein)	153 (46.9%)	70 (23.4%)	<0.0001
Positive Atopieanamnese der Mutter (ja/nein)	162 (49.6%)	124 (41.4%)	0.039
Positive Atopieanamnese des Vaters (ja/nein)	155 (47.5%)	101 (33.7%)	0.0002

Tabelle 3.3.: Typische Verhaltensweisen des traditionellen Bauernhoflebens in der PASTURE-Gesamtpopulation

	Kontrollen	Bauern	
	(N=326, 52.2 %)	(N=299, 47.8 %)	p-Wert
Konsum von Bauernmilch während der SS	41 (12.5%)	221 (73.9%)	<0.0001
- Wenn ja, Konsum von ungekochter Bauernmilch (ja/nein)	33 (80.5%)	184 (83.6%)	0.62
- Wenn ja, Konsum von nicht entrahmter Bauernmilch (ja/nein)	34 (82.9%)	183 (82.8%)	0.98
Konsum von Bauernbutter während der SS (mindestens einmal pro Woche)	5 (1.5%)	40 (13.4%)	<0.0001
Konsum von Bauernjoghurt während der SS (mindestens einmal pro Woche)	8 (2.5%)	37 (12.4%)	<0.0001
Durchschnittliche Zeit, die während der SS in Tierställen verbracht worden ist (median, min-max)	0 (0-19.4)	11.3 (0-60.7)	<0.0001
Durchschnittliche Zeit, die während der SS in Heuschobern verbracht worden ist (median, min-max)	0 (0-19.4)	1.2 (0-42)	<0.0001
Kontakt zu Stalltieren während der SS (mindestens einige Male im Monat)			
- Kontakt zu Kühen	64(19.6%)	266 (88.9%)	<0.0001
- Kontakt zu Schweinen	14(4.2%)	63 (21.0%)	<0.0001
- Kontakt zu Geflügel	42(12.8%)	95 (31.7%)	<0.0001
- Kontakt zu Ziegen und Schafen	26(7.9%)	63 (21.0%)	<0.0001

3.2.2. Vergleich der Studienteilpopulation Österreich mit der Gesamtpopulation

Tabelle 3.4. und 3.5. stellen soziodemographische und bauernhoftypische Charakteristiken der Subpopulation Österreich dar. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Geschlechterverteilung der österreichischen Kohorten. Wie schon für die Gesamtpopulation beschrieben sind Eltern der österreichischen Kontrollgruppe signifikant häufiger Raucher als Eltern der österreichischen Bauerngruppe (78,9% vs. 52,0%, $p=0,0036$). Dabei ist der Anteil rauchender Eltern innerhalb der österreichischen Studienpopulation größer als innerhalb der gesamten PASTURE-Population (66,7% vs. 62,8%), was vor allem auf einem höheren Prozentsatz an Rauchern der Kontrollgruppe beruht (78,9% vs. 69,3%). Wie auch für die Gesamtpopulation zu beobachten, rauchten während der Schwangerschaft mehr Mütter der Kontrollgruppe als Mütter der Bauernkohorte in der österreichischen Population (15,7% vs. 4,1%; $p=0,05$), der Anteil der während der Schwangerschaft rauchenden Mütter entspricht dabei in etwa dem Anteil der Gesamtpopulation (10,5% vs. 12,5%). Analog zur Gesamtpopulation lassen sich signifikante Unterschiede bezüglich des Ausbildungsgrades der österreichischen Eltern beider Kohorten feststellen. Während bei der Kontrollgruppe ein Überwiegen der Eltern mit hohem Ausbildungsgrad beobachtet werden konnte (75,4% vs. 24,5%), finden sich in der Gruppe der Bauern Eltern mit hohem und Eltern mit niedrigem Ausbildungsgrad zu gleichen Teilen (50% vs. 50%). Dabei ist der Anteil der Eltern mit niedrigem Ausbildungsgrad in Österreich geringer als in der Gesamtpopulation (36,2% vs. 51,4%). Entsprechend den Gesamtergebnissen aller Studienzentren lässt sich auch für Österreich ein hochsignifikantes Überwiegen Erstgebärender in der Kontrollgruppe erkennen. Während 87,7% der Mütter der Kontrollgruppe ihr erstes Kind austrugen, entbanden nur 22,9% der Bauernmütter zum ersten Mal ($p<0,0001$). Insgesamt liegt der Anteil der Erstgebärenden in der österreichischen Subgruppe über dem der Gesamtpopulation (58,1% vs. 35,7%), was vor allem durch den hohen Anteil Erstgebärender in der österreichischen Kontrollgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe der Gesamtpopulation bedingt ist (87,7% vs. 46,9%). Signifikante Unterschiede zeigen sich analog zur Gesamtpopulation im Vergleich der elterlichen Atopieanamnese. Eltern der österreichischen Kontrollgruppe weisen häufiger eine positive Atopieanamnese auf

als Eltern der Bauernkohorte. Während 40,3% der Mütter und 45,6% der Väter der Kontrollgruppe eine atopische Vorgeschichte haben, sind nur 20,8% der Bauernmütter und 12,5% der Bauernväter betroffen (Mütter: $p=0,0319$; Väter: $p<0,001$). Im Vergleich zur Gesamtpopulation weisen die österreichischen Eltern weniger häufig eine positive Atopieanamnese auf (Mütter: 31,4% vs. 45,8%, Väter: 30,5% vs. 41,0%), besonders die österreichischen Bauern unterscheiden sich dabei von den Bauern der Gesamtpopulation (österreichische Bauerneltern: Mütter: 20,8%, Väter: 12,5%; Bauerneltern der Gesamtpopulation: Mütter: 41,4%, Väter: 33,7%). Mütter der Bauernkohorte hatten während ihrer Schwangerschaft sowohl zu Haustieren als auch zu Stalltieren signifikant häufiger Kontakt. 91,6% bzw. 37,5% der Bauernmütter bejahten die Frage nach Katzen- bzw. Hundekontakt, während nur 15,7% bzw. 10,5% der Mütter der Kontrollgruppe entsprechenden Haustierkontakt angaben (Katzen: $p<0,0001$; Hunde: $p=0,001$). Wie schon für die Gesamtpopulation beobachtet, verbrachten Mütter der österreichischen Bauernkohorte hochsignifikant mehr Zeit in Tierställen und Heuschobern während der Schwangerschaft als Mütter der Kontrollgruppe. (Bauernkohorte: Tierställe: Median: 13,5 (h/Woche), $p<0,0001$; Heuschober: Median: 1,083 (h/Woche), $p<0,0001$). Mütter der österreichischen Bauernkohorte hatten deutlich öfter Kontakt zu Stalltieren (Kühen, Schweinen, Geflügel, Schafen) als Mütter der österreichischen Kontrollgruppe (jeweils $p<0,0001$). Dabei liegen die für die österreichischen Bauernmütter erhobenen Daten über den Daten der Bauernmütter der Gesamtpopulation, vor allem für den Kontakt zu Geflügel zeigen sich deutliche Unterschiede (Kühe: 91,6% vs. 88,9%, Schweine: 35,4% vs. 21,0%, Geflügel: 60,4% vs. 31,4%, Schafe: 31,2% vs. 21,0%). Sowohl innerhalb der österreichischen Teilpopulation als auch in der Gesamtpopulation gaben insgesamt 41,9% der Mütter an, während ihrer Schwangerschaft Bauernmilch konsumiert zu haben. Wie schon für die Gesamtpopulation lässt sich auch für Österreich beobachten, dass Mütter der Bauernkohorte hochsignifikant häufiger Bauernmilch während ihrer Schwangerschaft konsumierten als Mütter der Kontrollgruppe (81,2% vs. 8,7%; $p<0,0001$), wobei innerhalb der Kontrollgruppe die österreichischen Frauen weniger häufig diese Milch konsumierten als die Mütter dieser Gruppe insgesamt (8,7% vs. 12,8%).

Tabelle 3.4.: Soziodemographische Faktoren der Studienteilpopulation Österreich

	Kontrollen	Bauern	
	(N=57; 54,2%)	(N=48; 45,7%)	p-Wert
Geschlecht des neugeborenen Kindes: Junge (ja/nein)	30 (52,6%)	27 (43,7%)	0,7844
Elterliches Rauchen (ja/nein)	45 (78,9%)	25 (52,0%)	0,0036
Mutter rauchte während der SS (ja/nein)	9 (15,7%)	2 (4,1%)	0,0527
Niedriger Ausbildungsgrad der Eltern (ja/nein)	14 (24,5%)	24 (50,0%)	0,0069
Erstes Kind der Mutter (ja/nein)	50 (87,7%)	11 (22,9%)	<0,0001
Positive Atopieanamnese der Mutter (ja/nein)	23 (40,3%)	10 (20,8%)	0,0319
Positive Atopieanamnese des Vaters (ja/nein)	26 (45,6%)	6 (12,5%)	0,0002

Tabelle 3.5.: Typische Verhaltensweisen des traditionellen Bauernhoflebens in der Studienteilpopulation Österreich

	Kontrollen	Bauern	
	(N=57; 54,2%)	(N=48; 45,7%)	p-Wert
Konsum von Bauernmilch während der SS	5 (8,7%)	39 (81,2%)	<0,0001
Durchschnittliche Zeit, die während der SS in Tierställen verbracht worden ist (median, min-max)	0 (0-1,5)	13,25 (0-60,67)	<0,0001
Durchschnittliche Zeit, die während der SS in Heuschobern verbracht worden ist (median, min-max)	0 (0-0,5)	1.083 (0-21,0)	<0,0001
Kontakt zu Stalltieren während der SS: (mindestens einige Male im Monat)			
- Kontakt zu Kühen	11 (19,20%)	44(91,6%)	<0.0001
- Kontakt zu Schweinen	3 (5,2%)	17 (35,4%)	<0.0001
- Kontakt zu Geflügel	8 (14,0%)	29 (60,4%)	<0.0001
- Kontakt zu Ziegen und Schafen	3 (5,2%)	15 (31,2%)	<0.0001

3.3. Zytokinmessungen

Proben für die Zytokinanalyse konnten nur von 69,4% (n=807) der Gesamtpopulation (Österreich: 57,1% (n=105)) gewonnen werden. Das ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Hebammen teilweise vergaßen die Nabelschnurblutproben zu entnehmen, in anderen Fällen lagen Transportprobleme für die Proben vor oder die Proben erreichten das lokale Labor in koagulierter oder hämolytischer Weise, so dass die Richtigkeit der Ergebnisse nicht garantiert werden konnte. Insgesamt konnten 749 Nabelschnurblutproben zur Analyse gewonnen werden: 105 aus Österreich, 178 aus der Schweiz, 147 aus Deutschland, 195 aus Finnland und 124 aus Frankreich. 18 Proben mussten von der Zytokinanalyse ausgeschlossen werden, da die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Stimulation die vom Studienprotokoll geforderten 27h überschritten hätte. Weitere 41 Proben wurden auf Grund eines ungültigen Blutbildes nicht untersucht. Die 124 französischen Nabelschnurblutproben wurden nach der Zytokinbestimmung von der statistischen Analyse ausgeschlossen, da sie eine hohe Anzahl von Nullwerten aufwiesen. Außerdem wurde auch IL-12 von weiteren Analysen ausgeschlossen, da 85,7% der Proben IL-12-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze aufwiesen.

3.3.1. Prävalenz und Verteilung der Zytokine

Abb. 3.2. stellt Prävalenz und Verteilung der gemessenen Zytokine dar. Die aussagekräftigsten Messergebnisse für die Zytokine ließen sich nach Stimulation der Nabelschnurblutproben mit PMA + Ionomycin nach 48h Inkubation erzielen. Die Zytokinlevel der Bauern- sowie der Nichtbauern-Neugeborenen wurden miteinander verglichen. Nachfolgende Graphik (Abb.1) veranschaulicht den prozentualen Anteil der Proben, in denen Zytokinkonzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze detektiert werden konnten. Dabei ergaben sich für alle Studienzentren ähnliche Ergebnisse, wobei die Detektierbarkeit der Zytokine unterschiedlich war. Die meisten Werte unterhalb der Nachweisgrenze lagen für IL-12 vor (85,7%), während 24,6% der IFN- γ -Messungen, 23,5% der TNF- α -Messungen, 26,4% der IL-5-Messungen und 51,2% der IL-10-Messungen Werte unterhalb der Nachweisgrenze ergaben. Bezüglich der Detektierbarkeit der jeweiligen Zytokine konnten keine signifikante Unterschiede

zwischen den Studienzentren festgestellt werden, die Mediane der Anzahl der Werte oberhalb der Nachweisgrenze unterscheiden sich nicht signifikant.

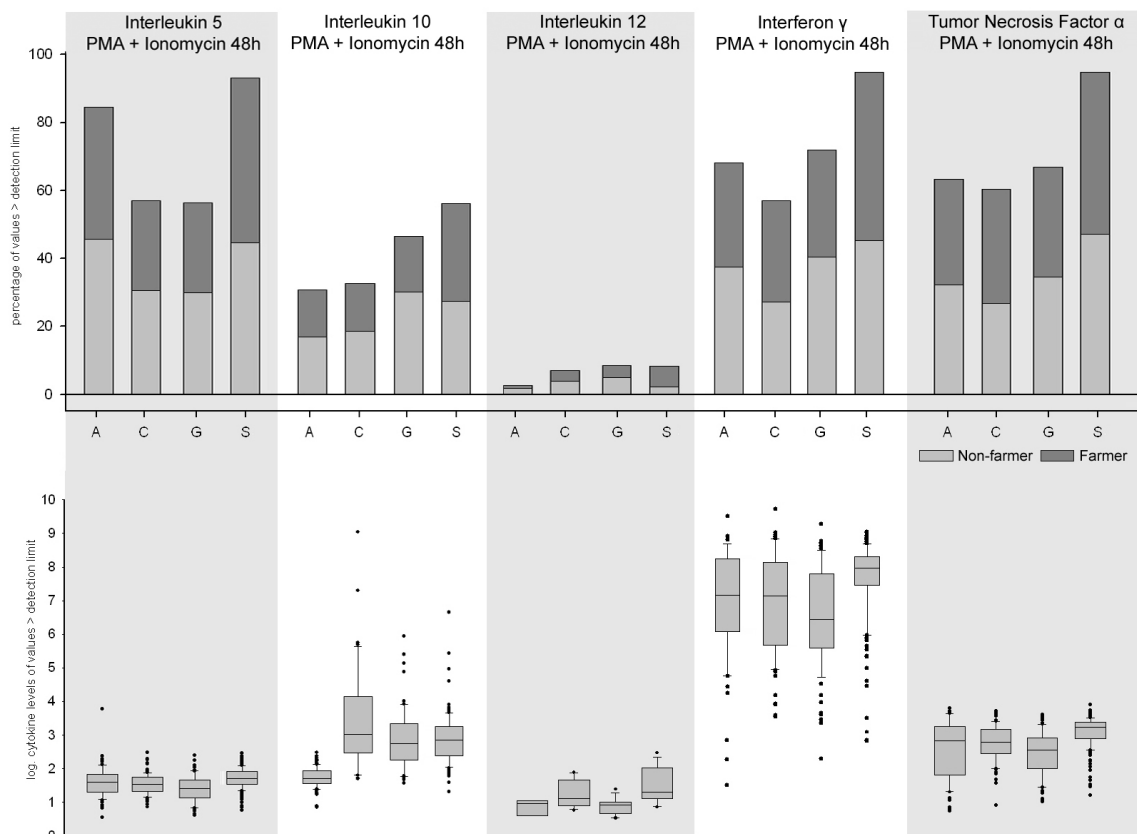


Abbildung 3.2.: Prävalenz und Verteilung der Zytokine

Obere Graphik: Verteilung der Zytokinkonzentrationen nach PMA + Ionomycin-Stimulation des Nabelschnurblutes nach 48 Stunden Inkubation; Bauern (schwarzer Balkenabschnitt); Nicht-Bauern (grauer Balkenabschnitt);

Gesamthöhe der Balken.: Prozentsatz der Proben über der Nachweisgrenze (xxx)

A: Österreich; C: Schweiz; D: Deutschland; S: Finnland

Untere Graphik: Boxplots der Messergebnisse

Quelle: G. Büchele, Ulm

IL-5 ließ sich im überwiegenden Teil der Proben nachweisen (55%-90%). Die Abweichung der Einzelproben vom Medianwert, wie im Boxplot erkenntlich, ist äußerst gering. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Bauern- und der Nicht-Bauernpopulation ist nicht erkennbar. Verglichen damit war IL-10 in deutlich weniger Proben nachweisbar (30% (Österreich) -55% (Finnland)). Die Validität der IL-10-Messung fällt deutlich geringer aus, wie in der Boxplot-Darstellung an einem vergrößerten Interquartilsabstand zu erkennen ist. Die Verteilung zwischen Bauern und

Nicht-Bauern ist nahezu ausgewogen. Lediglich bei den deutschen Proben fällt ein Übergewicht der messbaren IL-10-Konzentrationen bei den Nicht-Bauern auf. IL-12 war nur in einem geringen Anteil der Proben nachweisbar (3% (Österreich)- 5% (Finnland)), wobei die Streuung der Messwerte sehr gering ausfällt. Der Anteil der detektierbaren Proben ist unter den Studienpopulationen ungleich verteilt. Während bei den österreichischen Proben die Nicht-Bauernproben überwiegen, liegen bei den finnischen Proben deutlich mehr Bauernproben über der Nachweisgrenze. IFN- γ war in einem äußerst hohen Prozentsatz der Proben nachweisbar (60% (Schweiz)-98% (Finnland)). Die Messwerte zeigen eine sehr ausgeprägte Streuung um den Median. Die Verteilungen unter den Bauern und den Nicht-Bauern ist ausgeglichen. TNF- α konnte in beiden Populationen gleich häufig nachgewiesen werden (60% (Österreich)-97% (Finnland)). Die Validität der Messungen ist gut, was sich in der Boxplot-Darstellung erkennen lässt. Insgesamt zeichnen sich die Messergebnisse studienzentrenübergreifend durch ähnliche Mediane sowie, mit Ausnahme von IFN- γ , durch eine geringe Streubreite aus.

3.4. Zusammenhang zwischen demographischen Einflussgrößen und Zytokinwerten in der PASTURE-Gesamtpopulation

Die in Tabelle 3.6. dargestellte Untersuchung des Zusammenhanges zwischen bestimmten demographischen Faktoren und den im Nabelschnurblut gemessenen Konzentrationen der Zytokine IL-5, IL-10, IFN- γ und TNF- α erfolgte mit Hilfe des multivariaten Tobit Regressions Modells (Procedure QLIM in SAS®, SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc 9.1.3., 2006). Es erfolgte eine Adjustierung für Studienzentrum, Bauernstatus und wenn notwendig für Geschlecht, mütterliches Rauchen, Anzahl der Geschwister, mütterliches Alter bei Geburt des Kindes sowie mütterlicher Asthma- und Heuschnupfenanamnese. Männliche Neugeborene beider Kohorten zeigten erhöhte TNF- α -Spiegel nach Stimulation ($p=0,019$). Mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft wirkte sich auf die IL-5-Konzentration der Kinder hochsignifikant mindernd aus, während eine positive Heuschnupfenanamnese der Mutter mit einer Konzentrationssteigerung von IL-5 einherging ($p=0,0012$). Hat das Kind ältere Geschwister, lassen sich signifikant erhöhte IL-10- sowie IFN- γ -Werte nachweisen.

Tabelle 3.6.: Effekt von demographischen Faktoren auf die Zytokinproduktion von CBMCs (PASTURE-Gesamtpopulation)

	IL-5		IL-10		IFN- γ		TNF- α	
Demographische Faktoren	GMR [95% KI]	p	GMR [95% KI]	p	GMR [95% KI]	p	GMR [95% KI]	p
Geschlecht (Junge)	1,05 [0,91; 1,23]	0,5	0,97 [0,75; 1,26]	0,85	1,11 [0,82; 1,51]	0,49	1,4 [1,06; 1,85]	0,019
Mütterliches Rauchen während der SS (ja)	0,64 [0,51; 0,81]	0,00024	0,8 [0,54; 1,20]	0,29	0,68 [0,43; 1,08]	0,11	0,74 [0,48; 1,15]	0,19
Ältere Geschwister (ja)	0,93 [0,75; 1,15]	0,5	1,37 [1,02; 1,83]	0,035	1,6 [1,04; 2,46]	0,033	1,13 [0,82; 1,54]	0,46
Mütterliche Heuschnupfenanamnese	1,32 [1,11; 1,55]	0,00012	0,92 [0,70; 2,46]	0,59	1,31 [0,94; 1,83]	0,11	0,92 [0,67; 1,26]	0,6

Zytokinkonzentrationen in Nabelschnurblutproben nach Stimulation mit PMA/Ionomycin (48h Inkubation)

GMR = Geometric Means Ratio

[95% KI] = Konfidenzintervall 95%

Daten nach G. Büchele, Ulm

3.5. Effekt der bauernhoftypischen Expositionen und des Konsums von Bauernprodukten auf die Zytokinkonzentrationen im Nabelschnurblut

Die Konzentrationen der Zytokine IL-5, IL-10, IFN- γ und TNF- α wurden mit dem Bauernstatus und mit typischen Bauernexpositionen sowie im Besonderen mit dem Konsum von Bauernprodukten assoziiert. Die Auswertung für den Bauernstatus erfolgte mit Hilfe des Cochran-Armitage-Trend-Tests (siehe Tabelle 3.7.) sowie in Verbindung mit den anderen Variablen mit Hilfe des multivariaten Tobit Regressions Modells (Procedure QLIM in SAS®, SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc 9.1.3., 2006 (siehe Tabelle 3.8. und 3.9.)). Dabei wurden eine Adjustierung für Studienzentrum, Bauernstatus und wenn notwendig für Geschlecht, mütterliches Rauchen, Anzahl der älteren Geschwister, mütterliches Alter bei Geburt des Kindes sowie mütterlicher Asthma- und Heuschnupfenanamnese vorgenommen. Außerdem erfolgte für einzelne Werte eine zusätzliche gegenseitige Adjustierung. Die Auswertung der österreichischen Ergebnisse ergab bis auf einen signifikanten Zusammenhang (IL-10 und Aufenthalt der Mutter in Heuschobern), keine signifikanten Assoziationen zwischen Zytokinkonzentrationen und Expositionen (siehe Tabelle 3.10 bis 3.16), so dass im Folgenden tendenzielle Veränderungen beschrieben werden.

3.5.1. Bauernstatus

Neugeborene der Bauernkohorte weisen signifikant höhere IFN- γ -Werte auf als Neugeborene der Kontrollgruppe. Dieser Zusammenhang ist jedoch nach Adjustierung für die anderen untersuchten Variablen im Tobit Regressions Modell nicht mehr signifikant. Die TNF- α -Werte in den Bauernproben sind ebenfalls erhöht ($p=0,064$), auch nach erfolgter Adjustierung im Tobit Regressions Modell ($GMR=1,34$, $p=0,039$) (Tabelle 3.7. und 3.8.).

Die Ergebnisse für die österreichischen Bauernproben zeigen ebenfalls trendmäßig erhöhte TNF- α -Werte ($OR=1,62$). Diese Assoziation ist jedoch nicht mehr nachzuweisen und wird sogar tendenziell negativ nach Adjustierung für Geschlecht, mütterliches Rauchen, Anzahl der älteren Geschwister, mütterliches Alter bei Geburt des Kindes sowie mütterlicher Asthma- und Heuschnupfenanamnese ($OR=0,92$). Für IFN- γ , IL-5 und IL-10 ergeben sich ebenfalls tendenziell erniedrigte Werte bei den österreichischen Bauernkindern im Vergleich zur Kontrollgruppe, die sich nach

Adjustierung sogar noch ausgeprägter darstellen (IFN- γ : OR=0,49 (adj.); IL-5: OR=0,88 (unadj.); IL-10: OR=0,38 (adj.), $p=0,0564$) (siehe Tabelle 3.10.).

3.5.2. Aufenthalt im Stall während der Schwangerschaft

Der Aufenthalt der Schwangeren in Tierställen geht mit keinen signifikanten Konzentrationserhöhungen der Zytokinspiegel einher, eine tendenziell positive Assoziation lässt sich für IL-5 (OR=1,20), IFN- γ (OR=1,28) und TNF- α (OR=1,19) feststellen, die sich für IL-5 (OR=1,14 (unadj.)) und TNF- α (OR=2,02 (unadj.), OR=1,54 (adj.)) auch bei den österreichischen Werten beobachten lässt. Im Gegensatz dazu konnte für IFN- γ eine negative Assoziation zum Stallaufenthalt der Mutter beobachtet werden (OR=0,64 (adj.)). IL-10 erscheint positiv assoziiert zum Stallaufenthalt der österreichischen Mütter (OR=1,37 (unadj.)), nach erfolgter Adjustierung ist dieser Effekt jedoch nicht mehr zu erkennen (OR=0,89 (adj.)) (siehe Tabelle 3.8. und 3.11.).

3.5.3. Aufenthalt in Heuschobern während der Schwangerschaft

Der Aufenthalt der Mutter in Heuschobern während der Schwangerschaft wirkt sich signifikant positiv auf die TNF- α -Konzentration aus ($p=0,022$). Außerdem ist eine tendenziell positive Assoziation für IFN- γ zu beobachten (OR=1,28). Auch die österreichischen Werte für TNF- α , sowie ebenfalls für IFN- γ und IL-10 lassen eine positive Assoziation zum Aufenthalt der Mutter in Heuschobern erkennen, die nach Adjustierung bestehen bleibt (TNF- α : OR=1,64 (unadj.), OR=1,40 (adj.); IFN- γ : OR=1,47 (unadj.), OR=1,62 (adj.)). Die IL-10-Konzentrationen sind dabei signifikant erhöht ($p=0,038$). Negative Assoziationen zur Heuschober-Exposition zeigt IL-5 (OR=0,88 (unadj.)) (siehe Tabelle 3.8. und 3.12.).

3.5.4. Kontakt zu Stalltieren während der Schwangerschaft

Deutlich signifikante konzentrationssteigernde Effekte auf IFN- γ sowie ebenfalls auf TNF- α hatte der Kontakt der Mutter zu Stalltieren während der Schwangerschaft (IFN- γ : OR=1,28, $p=0,0052$; TNF- α : OR=1,29, $p=0,0021$). Auch nach gegenseitiger

Adjustierung bleiben die Effekte des Tierkontaktes signifikant (IFN- γ : OR=1,16, $p=0,046$; TNF- α : OR=1,26, $p=0,0013$).

Die TNF- α -Konzentrationssteigerungen bilden sich auch in der isolierten Auswertung der österreichischen Daten ab, während hier für IFN- γ nach erfolgter Adjustierung kein konzentrationssteigernder Effekt für den Tierkontakt mehr zu erkennen ist. Die Konzentrationen von IFN- γ im Nabelschnurblut der österreichischen Kinder zeigen sogar eine negative Assoziation zum Kontakt der Mutter zu Tieren (OR=0,83 (adj.)), welche ebenfalls tendenziell für IL-5 zu beobachten ist (siehe Tabelle 3.8. und 3.13.).

3.5.5. Konsum von Bauernmilch während der Schwangerschaft

Der Genuss von roher Bauernmilch während der Schwangerschaft ist positiv assoziiert mit der Konzentration von IFN- γ im Nabelschnurblut (OR=1,24). Vor allem der Konsum von unentrahmter Milch hat signifikant konzentrationssteigernde Effekte (IFN- γ : OR=1,45; $p=0,047$), während für den Konsum von abgekochter Bauernmilch lediglich eine tendenziell positive Assoziation zu erkennen ist (IFN- γ : OR=1,40; TNF- α : OR=1,21).

Die Zytokinanalysen des Nabelschnurblutes der österreichischen Kinder ergaben ebenfalls einen Anstieg der INF- γ -Konzentration, der mit dem Genuss von Bauernmilch assoziiert ist und auch nach Adjustierung bestehen bleibt (OR=8,65 (unadj.), OR=2,99 (adj.)). Auch TNF- α und ausgeprägter auch IL-5 zeigen eine positive Assoziation, während die IL-10-Konzentrationen der österreichischen Neugeborenen negativ assoziiert sind mit dem Bauernmilchkonsum der Mütter (TNF- α : OR=1,11 (adj.), IL-5: OR=1,80 (unadj.), IL-10: OR=0,13 (adj.)) (siehe Tabelle 3.9. und 3.14.).

3.5.6. Konsum von selbst erzeugter Butter während der Schwangerschaft

Wurde von der Mutter während der Schwangerschaft aus der Bauernmilch selbst erzeugte Butter verzehrt, konnten im Nabelschnurblut der Neugeborenen erhöhte Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ (OR=4,74; $p<0,0001$) und TNF- α (OR=2,43; $p=0,0025$) gemessen werden. Nach gegenseitiger Adjustierung bleiben diese Effekte bestehen (IFN- γ : OR=4,97; $p<0,0001$; TNF- α : OR=2,49; $p=0,0025$). Zusätzlich zeigt sich eine signifikante Konzentrationserhöhung von IL-5 (OR=1,55; $p=0,0063$).

Die positive Assoziation zwischen dem Butterkonsum und der Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine bildet sich auch für die österreichischen Werte ab (IFN- γ : OR=3,18; TNF- α : OR=1,74) und ist auch nach Adjustierung noch zu beobachten (IFN- γ : OR=1,38; TNF- α : OR=2,00). Der konzentrationssteigernde Effekt auf die IL-5-Konzentration ist jedoch nicht zu erkennen unter den Ergebnissen der Auswertung der österreichischen Proben (OR=0,93 (adj.)). IL-10 zeigt für die Gesamtpopulation eine tendenziell negative Assoziation (OR=0,90), während für die österreichischen Proben eine Tendenz zur positiven Assoziation zum Butterkonsum zu erkennen ist, die sich nach Adjustierung sogar verstärkt (OR=1,89 (unadj.), OR=2,79 (adj.)) (siehe Tabelle 3.9. und 3.15.).

3.5.7. Konsum von selbst erzeugtem Joghurt während der Schwangerschaft

Der Konsum von Joghurt aus hauseigener Herstellung geht mit einer signifikanten Erniedrigung der Konzentrationen von IL-5 und IL-10 einher (IL-5: OR=0,55; $p=0,0003$; IL-10: OR=0,53; $p=0,037$), die auch nach gegenseitiger Adjustierung bestehen bleibt (IL-5: OR=0,49; $p=0,0063$; IL-10: OR=0,51; $p=0,023$). Für die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α zeigt sich ebenfalls eine tendenziell negative Assoziation (IFN- γ : OR=0,72; TNF- α : OR=0,62), die nach gegenseitiger Adjustierung statistische Signifikanz erreicht (IFN- γ : OR=0,44; $p=0,0094$; TNF- α : OR=0,36; $p=0,0016$).

Während sich die negative Assoziation zwischen dem Konsum von Bauernjoghurt und der Konzentration von IL-5 bei den österreichischen Werten analog zur Gesamtpopulation sowohl vor als auch nach Adjustierung darstellt (OR=0,79 (unadj.), OR=0,84 (adj.)), ist für TNF- α und IL-10 im Gegensatz zur Gesamtpopulation nach Adjustierung eine tendenziell positive Assoziation zu erkennen (TNF- α : OR=4,35 (adj.); IL-10: OR=1,92 (adj.)), während die Werte vor Adjustierung der Tendenz der Ergebnisse der Gesamtpopulation entsprechen (TNF- α : OR=0,62; IL-10: OR=0,82). Die Konzentrationen von IFN- γ im Nabelschnurblut der österreichischen Kinder zeigen eine tendenziell positive Assoziation zum Konsum der Mutter von Bauernjoghurt (OR=1,61), nach Adjustierung erscheint diese Assoziation jedoch negativ (OR=0,56) (siehe Tabelle 3.9. und 3.16.).

Tabelle 3.7.: Effekt des Bauernstatus auf die Zytokinproduktion von CBMCs (PASTURE-Gesamtpopulation)

	Kontrollen		Bauern		Trend-Test ^{&} p-Wert
	N	%	N	%	
IFN-γ					0.012 **
mv	23	7.1	24	8.0	
Unterhalb der Nachweisgrenze	87	26.7	67	22.4	
\leq Median [#]	123	37.7	90	30.1	
$>$ Median [#]	93	28.5	118	39.5	
TNF-α					0.064 *
mv	42	12.9	38	12.7	
Unterhalb der Nachweisgrenze	88	27.0	59	19.7	
\leq Median [#]	99	30.4	102	34.1	
$>$ Median [#]	97	29.8	100	33.4	
IL-5					0.70
mv	10	3.1	10	3.3	
Unterhalb der Nachweisgrenze	90	27.6	75	25.1	
\leq Median [#]	112	34.4	108	36.8	
$>$ Median [#]	114	35.0	106	34.8	
IL-10					0.38
mv	29	8.9	33	11.0	
Unterhalb der Nachweisgrenze	163	50.0	157	52.5	
\leq Median [#]	68	20.9	54	18.4	
$>$ Median [#]	66	20.3	55	18.1	
IL-12					0.53
mv	23	7.1	25	8.4	
Unterhalb der Nachweisgrenze	283	86.8	253	84.6	
\leq Median [#]	11	3.4	10	3.3	
$>$ Median [#]	9	2.8	11	3.7	

mv: missing value;

N: number of samples

& Cochran-Armitage-trend test

center-specific medians were used for categorisation

* significant differences between farmers and non-farmers (not considering mv): * p<0.1; ** p<0.05

Daten nach G. Büchele, Ulm

Tabelle 3.8.: Effekt von Bauernhofexpositionen auf die Zytokinproduktion von CBMCs (PASTURE-Gesamtpopulation)

	IL-5				IL-10				IFN- γ				TNF- α			
Bauernhofexpositionen	Ajusted		Mutually adj.&		Ajusted		Mutually adj.&		Ajusted		Mutually adj.&		Ajusted		Mutually adj.&	
	GMR	P	GMR	P	GMR	P	GMR	P	GMR	P	GMR	P	GMR	P	GMR	p
	[95% KI]		[95% KI]		[95% KI]		[95% KI]		[95% KI]		[95% KI]		[95% KI]		[95% KI]	
Bauernstatus (ja/nein)	0,99	0,94	§		0,85	0,22	§		1,22	0,2	§		1,34	0,039	§	
	[0,85; 1,16]				[0,66; 1,10]				[0,90; 1,98]				[1,01; 1,78]			
Aufenthalt in Tierställen während der SS)	1,2	0,096			0,99	0,96			1,28	0,26			1,41	0,096		
	[0,97; 1,48]				[0,69; 1,43]				[0,83; 1,98]				[0,94; 2,12]			
Aufenthalt in Heuschobern während der SS (pro 5h)	1,03	0,52			0,91	0,25			1,18	0,056			1,19	0,022		
	[0,95; 1,12]				[0,76; 1,07]				[1,00; 1,41]				[1,03; 1,38]			
Kontakt zu Stalltieren während der SS (score 0 bis 4)	0,97	0,58			0,95	0,48			1,28	0,0052	1,16		1,29	0,0021	1,26	0,0013
	[0,89; 1,07]				[0,81; 1,1]				[1,08; 1,52]		[1,00; 1,34]	0,046	[1,10; 1,51]		[1,10; 1,46]	

Zytokinwerte in Nabelschnurblutproben nach Stimulation mit PMA/Ionomycin (48h Inkubation): Tobit Regressions Modell

GMR = Geometric Means Ratio; [95% KI] = Konfidenzintervall 95%

Adjusted: mindestens adjustiert für Zenter und Bauernstatus und, wenn notwendig zusätzlich für Geschlecht, mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft Anzahl älterer Geschwister, mütterliches Alter bei Geburt, mütterliche Asthma- und Heuschnupfenanamnese

Mutually adjusted: signifikante Assoziationen, mutually adjusted and after backward selection

§ = Variablen sind aufgrund von Überadjustierung nicht in das mutually adjusted Modell eingeschlossen

Daten nach G. Büchele, Ulm

Tabelle 3.9.: Effekt des Konsums von Bauernprodukten auf die Zytokinproduktion von CBMCs (PASTURE-Gesamtpopulation)

	IL-5				IL-10				IFN- γ				TNF- α			
Konsum von Bauernprodukten	Ajusted		Mutually adj.&		Ajusted		Mutually adj.&		Ajusted		Mutually adj.&		Ajusted		Mutually adj.&	
	GMR	p	GMR	p	GMR	p	GMR	p	GMR	p	GMR	p	GMR	p	GMR	p
	[95% KI]		[95% KI]		[95% KI]		[95% KI]		[95% KI]		[95% KI]		[95% KI]		[95% KI]	
Bauernmilch	1,08	0,46	§		0,94	0,7	§		1,24	0,3	§		1,01	0,94	§	
	[0,88; 1,32]					[0,67; 1,31]				[0,83; 1,86]				[0,70; 1,47]		
Bauernmilch: nicht abgekocht	1,15	0,13			1,18	0,3			1,4	0,07			1,21	0,27		
	[0,96; 1,39]					[1,86; 1,61]				[0,97; 2,02]				[0,86; 1,79]		
Bauernmilch: nicht entrahmt	1,09	0,39			1,23	0,2			1,45	0,0047			1,32	0,11		
	[0,90; 1,31]					[0,90; 1,68]				[1,00; 2,10]				[0,94; 1,86]		
Butter aus Bauernmilch	1,28	0,12	1,55	0,0063	0,9	0,71			4,74	<0,0001	4,97	<0,0001	2,43	0,0017	2,49	0,0025
	[0,94; 1,74]		[1,13; 2,11]			[0,52; 1,56]				[2,63; 8,56]		[2,71; 9,12]		[1,39; 4,23]		[1,38; 4,50]
Joghurt aus Bauernmilch	0,55	0,0003	0,49	<0,0001	0,53	0,037	0,51	0,023	0,72	0,31	0,44	0,0094	0,62	0,12	0,36	0,0016
	[0,39; 0,76]		[0,35; 0,68]			[0,30; 0,96]		[0,29; 0,91]		[0,39; 1,35]		[0,23; 0,82]		[0,34; 1,13]		[0,19; 0,68]

Zytokinwerte in Nabelschnurblutproben nach Stimulation mit PMA/Ionomycin (48h Inkubation): Tobit Regressions Modell

GMR = Geometric Means Ratio; [95% KI] = Konfidenzintervall 95%

Adjusted: mindestens adjustiert für Zenter und Bauernstatus und, wenn notwendig zusätzlich für Geschlecht, mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft, Anzahl älterer Geschwister, mütterliches Alter bei Geburt, mütterliche Asthma- und Heuschnupfenanamnese

Mutually adjusted: signifikante Assoziationen, mutually adjusted and after backward selection

§ = Variablen sind aufgrund von Überadjustierung nicht in das mutually adjusted Modell eingeschlossen

Daten nach G. Büchele, Ulm

Tabelle 3.10.: Effekt des Bauernstatus auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)

Bauernstatus	Adjustierung	GMR	KI	P-Wert
TNF-α	unadjustiert	1,62	(0,67-3,92)	0,28
	Adjustiert	0,92	(0,27-3,11)	0,89
IFN-γ	unadjustiert	0,89	(0,37-2,17)	0,80
	Adjustiert	0,49	(0,16-1,54)	0,22
IL-5	unadjustiert	0,98	(0,71-1,36)	0,90
	Adjustiert	0,88	(0,59-1,33)	0,55
IL-10	unadjustiert	1,02	(0,52-2,01)	0,96
	Adjustiert	0,38	(0,14-1,03)	0,056

Tabelle 3.11.: Effekt des Aufenthalts der Mutter im Stall während der Schwangerschaft auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)

Aufenthalt im Stall während der Schwangerschaft	Adjustierung	GMR	KI	P-Wert
TNF-α	Unadjustiert	2,02	(0,55-7,41)	0,29
	Adjustiert	1,54	(0,43-5,58)	0,51
IFN-γ	Unadjustiert	0,76	(0,21-2,7)	0,67
	Adjustiert	0,64	(0,18-2,25)	0,48
IL-5	Unadjustiert	1,14	(0,75-1,73)	0,55
	Adjustiert	1,05	(0,7-1,59)	0,80
IL-10	Unadjustiert	1,37	(0,52-3,85)	0,53
	Adjustiert	0,89	(0,34-2,32)	0,81

Tabelle 3.12.: Effekt des Aufenthalts der Mutter im Heuschober während der Schwangerschaft auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)

Aufenthalt im Heuschober während der Schwangerschaft	Adjustierung	GMR	KI	P-Wert
TNF-α	Unadjustiert	1,64	(0,66-4,09)	0,29
	Adjustiert	1,4	(0,56-3,47)	0,47
IFN-γ	Unadjustiert	1,47	(0,6-3,62)	0,40
	Adjustiert	1,62	(0,65-4,04)	0,30
IL-5	Unadjustiert	0,88	(0,65-1,21)	0,44
	Adjustiert	0,9	(0,66-1,23)	0,51
IL-10	Unadjustiert	1,85	(1,01-3,4)	0,047
	Adjustiert	1,88	(1,03-3,42)	0,038

Tabelle 3.13.: Effekt des Kontaktes der Mutter zu Stalltieren während der Schwangerschaft auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)

Kontakt zu Stalltieren während der Schwangerschaft	Adjustierung	GMR	KI	P-Wert
TNF-α	Unadjustiert	1,08	(0,69-1,69)	0,74
	Adjustiert	1,06	(0,65-1,73)	0,82
IFN-γ	Unadjustiert	1,1	(0,7-1,73)	0,69
	Adjustiert	0,83	(0,5-1,38)	0,47
IL-5	Unadjustiert	0,91	(0,77-1,08)	0,27
	Adjustiert	0,94	(0,78-1,13)	0,49
IL-10	Unadjustiert	1,08	(0,75-1,75)	0,67
	Adjustiert	0,99	(0,66-1,49)	0,97

Tabelle 3.14.: Effekt des Konsums von Bauernmilch während der Schwangerschaft auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)

Konsum von Bauernmilch während der Schwangerschaft	Adjustierung	GMR	KI	P-Wert
TNF-α	Unadjustiert	0,8	(0,02-40,3)	0,91
	Adjustiert	1,11	(0,02-65,82)	0,96
IFN-γ	Unadjustiert	8,65	(0,24-317,82)	0,24
	Adjustiert	2,99	(0,07-124,85)	0,57
IL-5	Unadjustiert	1,8	(0,47-6,88)	0,39
	Adjustiert	1,79	(0,46-6,97)	0,40
IL-10	Unadjustiert	0,25	(0,01-5,01)	0,36
	Adjustiert	0,13	(0,01-2,66)	0,19

Tabelle 1.15.: Effekt des Konsums von Bauernbutter während der Schwangerschaft auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)

Konsum von Bauernbutter während der Schwangerschaft	Adjustierung	GMR	KI	P-Wert
TNF-α	Unadjustiert	1,74	(0,28-10,85)	0,55
	Adjustiert	2	(0,23-17,38)	0,53
IFN-γ	Unadjustiert	3,18	(0,51-19,71)	0,21
	Adjustiert	1,38	(0,17-11,03)	0,76
IL-5	Unadjustiert	0,67	(0,33-1,36)	0,27
	Adjustiert	0,93	(0,43-1,98)	0,84
IL-10	Unadjustiert	1,89	(0,5-7,14)	0,35
	Adjustiert	2,79	(0,66-11,85)	0,16

Tabelle 3.16.: Effekt des Konsums von Bauernjoghurt während der Schwangerschaft auf die Zytokinproduktion von CBMCs (Österreich)

Konsum von Bauernjoghurt während der Schwangerschaft	Adjustierung	GMR	KI	P-Wert
TNF-α	Unadjustiert	0,62	(0,06-6,34)	0,69
	Adjustiert	4,35	(0,24-79,83)	0,32
IFN-γ	Unadjustiert	1,61	(0,17-15,36)	0,68
	Adjustiert	0,56	(0,03-9,14)	0,69
IL-5	Unadjustiert	0,79	(0,34-1,85)	0,59
	Adjustiert	0,84	(0,31-2,24)	0,72
IL-10	Unadjustiert	0,82	(0,13-5,06)	0,83
	Adjustiert	1,92	(0,24-15,16)	0,54

Tabelle 3.10.-3.16.:

Unadjustiert: Adjustierung für Bauernstatus

Adjustiert: Adjustiert für Bauernstatus, Geschlecht, Rauchen der Mutter während der Schwangerschaft, Anzahl der älteren Geschwister, Alter der Mutter, Asthma- und Heuschnupfenanamnese der Mutter

KI=Konfidenzintervall 95%

Man nehme immer unadjustiert, außer wenn der Schätzer für MR sich durch die Adjustierung um >15% verändert, dann nehme man adjustiert.

Daten nach G. Büchele, Ulm

4. Diskussion

Lymphozyten entwickeln sich innerhalb des menschlichen Fetus während des ersten Trimesters aus lymphatischen Stammzellen, die sich in der Leber aufhalten. Schon pränatal beginnt die Reifung des adaptiven Immunsystems. Von der 20. Schwangerschaftswoche an ist der Fetus fähig, auf externe Stimuli mit einer Immunantwort zu reagieren, z.B. auf Pathogene oder auch auf Nahrungsmittelallergene^{15,105}. Während der Entwicklungsphase reagieren die beteiligten Faktoren des Abwehrsystems sehr sensibel auf unterschiedliche Einflüsse. Die Entstehung von Allergien wie auch der Schutz vor ihrer Entstehung wird mit Veränderungen in dieser frühen Entwicklungsphase in Zusammenhang gebracht, die sowohl auf genetische Faktoren als auch auf die Anwesenheit von verschiedenen Umweltfaktoren zurückgeführt werden können.

So beeinflussen verschiedene Faktoren und Expositionen, die mit dem traditionellen Leben auf einem Bauernhof assoziiert sind, die Entwicklung des kindlichen Immunsystems und vermitteln einen relativen Schutz vor der Entstehung von atopischen Erkrankungen^{23,47,130,158}. Ergebnisse epidemiologischer Studien^{47,135} deuten darauf hin, dass dieser Schutz nicht nur postpartal vermittelt wird, sondern auch schon intrauterin angelegt wird.

Unserer Arbeitshypothese entsprechend, nach der diese intrauterin vermittelten Effekte mit Unterschieden bezüglich des Immunstatus neugeborener Bauernkinder einhergehen, wurden in dieser Arbeit die Zytokine IL-5, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α nach Stimulation in Nabelschnur-Vollblutproben von Bauern- und Nicht-Bauernkindern quantitativ bestimmt und mit bestimmten demographischen Faktoren sowie Expositionen des bäuerlichen Lebens assoziiert.

Assoziationen zwischen Zytokinexpression der CBMCs und demographischen Faktoren

Die Zytokinproduktion im Nabelschnurblut Neugeborener zeigt breite Variationen und lässt auf den Effektorstatus der Zellen des adaptiven Immunsystems und damit indirekt auch auf Unterschiede in der intrauterinen Entwicklung des Abwehrsystems schließen. Es finden sich Zusammenhänge zwischen der Produktion einzelner Zytokine und bestimmten Faktoren: Studien zeigen, dass CBMCs (Cord blood mononuclear cells) von Kindern, deren Mütter eine atopische Anamnese aufweisen, vergleichsweise weniger IFN- γ ^{68,81,123} sowie vermehrt IL-5^{100,178} produzieren. Diesen Beobachtungen entsprechend konnte in dieser Arbeit eine Assoziation zwischen einer positiven Heuschnupfenanamnese der Mutter und gesteigerter IL-5-Produktion der CBMCs beobachtet werden. Darüber hinaus konnte mütterliches Rauchen während der Schwangerschaft, ein bekannter Risikofaktor für die Entstehung allergischer Erkrankungen^{93,143}, mit erniedrigten IL-5-Werten assoziiert werden.

Strachnan et al. zeigten, dass Kinder die mehrere ältere Geschwister haben, bzw. Kinder, die in großen Familien leben, ein geringeres Risiko für die Entwicklung von allergischen Erkrankungen haben¹⁴⁶. Diese Beobachtung wurde unter anderem auf vermehrte Infektionen in den ersten Lebensjahren, resultierend auf gegenseitiger Ansteckung unter den Kindern, zurückgeführt. Unsere Ergebnisse zeigen nun, dass sich schon in den Zytokinprofilen der Neugeborenen signifikante Unterschiede zwischen Kindern ohne und Kindern mit älteren Geschwistern abzeichnen. Nabelschnurblutzellen von Kindern, die ältere Geschwister haben, produzierten nach polyklonaler Stimulation signifikant mehr IL-10 und mehr IFN- γ als die Zellen Erstgeborener. Auch Macaubas et al. konnten eine erhöhte IL-10-Produktion von CBMCs Erstgeborener nachweisen⁹³.

Assoziationen zwischen Zytokinexpression der CBMCs und mütterlichen Bauernhofexpositionen (PASTURE-Population)

Unserer Arbeitshypothese entsprechend konnte ein Zusammenhang zwischen den Zytokinmustern der Neugeborenen und dem Bauernstatus der Mutter sowie bestimmten Expositionen, durch die das Leben auf dem Bauernhof charakterisiert ist, festgestellt

werden. Vor allem für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ ließen sich deutliche Effekte erkennen. Sowohl IFN- γ ($p=0,012$), als auch TNF- α ($p=0,064$) lagen in den kindlichen Bauernproben in erhöhten Konzentrationen vor. Das zeigt sowohl eine Aktivierung des angeborenen (TNF- α) als auch des erworbenen Immunsystems (IFN- γ) an. Nach Adjustierung für die anderen untersuchten Variablen im Tobit Regressions Modell fiel die Assoziation zwischen Bauernstatus und IFN- γ nicht mehr signifikant aus, während sich signifikante Zusammenhänge zum Kontakt der Schwangeren zu Stalltieren ($p=0,0052$) darstellten (siehe Abb. 4.1.).

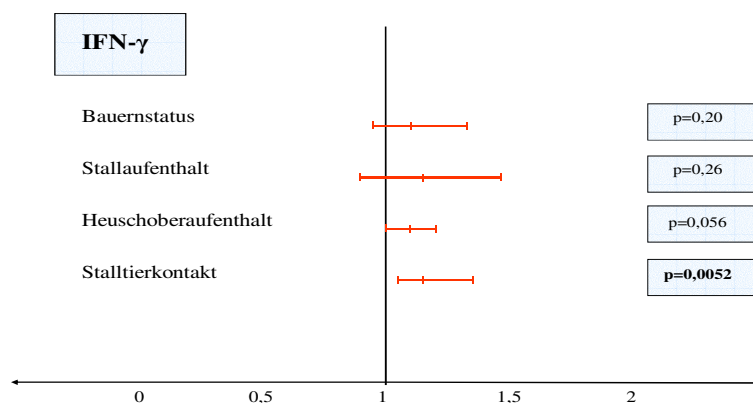


Abbildung 4.1.: Effekt der Bauernhofexpositionen auf die IFN- γ -Werte im Nabelschnurblut: Darstellung der Konfidenzintervalle (95%), GMRs und p-Werte nach Berechnung und Adjustierung der Werte im Tobit Regressions Modell (siehe Tabelle 3.8.)

Auch für den Aufenthalt der Mutter in Heuschobern konnten in dieser Arbeit tendenziell erhöhte IFN- γ -Werte in den Nabelschnurblutproben festgestellt werden ($p=0,056$). Dieses deutet darauf hin, dass die erhöhten IFN- γ -Werte, die mit dem Bauernstatus assoziiert sind, durch den Stalltierkontakt der Mutter und den Aufenthalt der Mutter in Heuschobern während der Schwangerschaft erklärt werden können (siehe Abb. 4.1.). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Roponen et al. 2005 lediglich für periphere Blutzellen drei Monate alter Kinder einen signifikanten Zusammenhang zwischen Bauernstatus und IFN- γ herstellen, nicht jedoch für Nabelschnurblutzellen¹³⁵. In besagter Studie wurden die Zellen jedoch mit PMA und ConA stimuliert. Außerdem lagen andere Sensitivitäten für IFN- γ vor.

Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass nicht nur der Konsum von Bauernmilch durch die Kinder selbst mit erhöhten IFN- γ -Werten einhergeht, wie Perkin and Strachan zeigten¹¹⁹, sondern, dass auch der Konsum dieser Milch durch die Mutter zu signifikant erhöhten, bereits im Nabelschnurblut messbaren, IFN- γ -Werten führt (nicht entrahmte Milch).

Die Assoziationen zwischen der TNF- α -Produktion der CBMCs und dem Bauernstatus erreichen nach Adjustierung im Tobit Regressions Modell signifikanten Charakter. Die Ergebnisse zeigen, dass auch der Aufenthalt der Schwangeren in Heuschobern ($p=0,022$) und in Ställen ($p=0,096$) sowie der mütterliche Kontakt zu Stalltieren während der Schwangerschaft ($p=0,0021$) Auswirkungen auf die TNF- α -Produktion der CBMCs haben, so dass indirekt auf eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch diese Faktoren geschlossen werden kann.

Eine Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine im Nabelschnurblut konnte in früheren Untersuchungen in Zusammenhang gebracht werden mit Stress, dem die Kinder bei der Geburt ausgesetzt waren. Eine vaginale Geburt ist für den Fetus mit weitaus mehr Stress verbunden als eine elektive sectio caesarea, dementsprechend lassen sich höhere Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-6 und TNF- α im Nabelschnurblut von Neugeborenen messen, die vaginal geboren wurden^{27,96,139}. Die Art und Weise der Geburt stellt demnach einen potentieller Confounder in unserer Studienpopulation dar. Da aber beide Geburtsmodi in der Bauern- und in der Nicht-Bauernkohorte gleich verteilt sind, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Confounder die Ergebnisse nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Assoziationen zwischen Zytokinexpression der CBMCs und mütterlichen Bauernhofexpositionen (Studienteilpopulation Österreich PASTURE-Population)

Die Auswertung der österreichischen Daten ergab keine signifikanten Assoziationen zwischen den Zytokinkonzentrationen und den untersuchten Variablen. Lediglich für IL-10 ließ sich ein signifikanter Zusammenhang herstellen: der Aufenthalt der Mutter in Heuschobern während der Schwangerschaft ging mit erhöhter IL-10-Produktion der

CBMCs einher (OR=1,85) (siehe Abb. 4.2.). Auch nach vorgenommener Adjustierung der Werte ließ sich diese signifikante Assoziation feststellen (OR=1,88). Alle anderen Assoziationen waren, im Gegensatz zu den für die Gesamtpopulation aufgestellten Zusammenhängen, nicht signifikant. Das könnte auf die geringere Fallzahl zurückgeführt werden (Österreich: n=105; Gesamtpopulation: n=625). Tendenzielle Veränderungen, die auf Assoziationen zwischen den Zytokinkonzentrationen und den untersuchten Expositionen hindeuten, aber auch Ergebnisse zufälliger Verteilung sein könnten, sind beschrieben worden und werden im Folgenden diskutiert.

Die für die österreichischen Werte beobachteten signifikanten Assoziationen zwischen IL-10 und dem Aufenthalt der Mutter in Heuschobern während der Schwangerschaft konnten für die Gesamtpopulation nicht festgestellt werden. Da sich die Bauernfrauen der Gesamtpopulation ungefähr gleich viele Stunden pro Woche (median: 1,2h pro Woche) in Heuschobern aufhielten wie die österreichischen Bauernfrauen (median: 1,1h pro Woche), beruht dieses nicht auf Unterschieden bezüglich der Expositionszeit, sondern könnte vielmehr auf regionale Unterschiede innerhalb der Variable „Aufenthalt im Heuschober“ zurückzuführen sein. Landwirtschaftliche Praktiken der österreichischen Bauern bezüglich Heutrocknung und -lagerung unterscheiden sich von denen der Gesamtpopulation. 86% der Bauern der Gesamtpopulation gaben an, Heu natürlich zu trocknen, 69% davon ausschließlich natürlich, ohne den Einsatz von warmer oder kalter Luft. In Österreich ist der Anteil der natürlichen Heutrocknung höher: 94% trocknen natürlich, davon 76% ausschließlich natürlich. Große Unterschiede finden sich auch bezüglich der Heulagerung. Während in der Gesamtpopulation das Heu genauso häufig lose (41%) wie in Ballen (39%) gelagert wird, wird von den österreichischen Bauern die lose Lagerung (71%) des Heus der Ballenlagerung (14%) vorgezogen (PASTURE: Final Report).

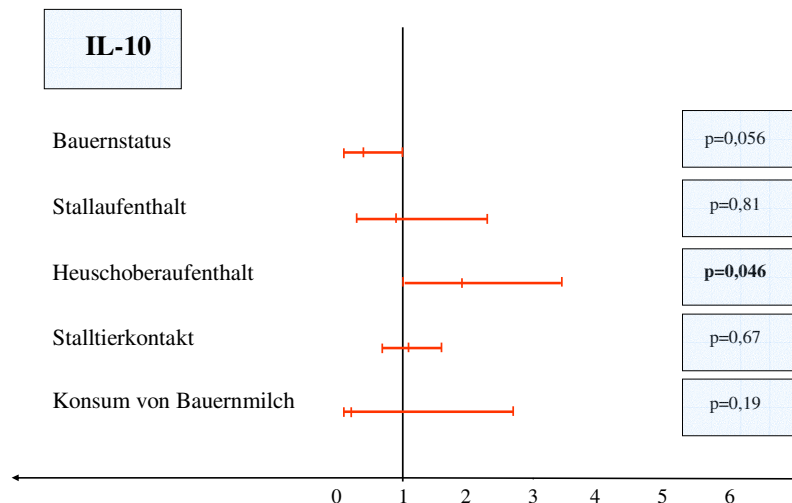


Abbildung 4.2.: Effekt der Bauernhofexpositionen auf die IL-10-Werte in den österreichischen Nabelschnurblutproben: Darstellung der Konfidenzintervalle (95%), OR und p-Werte (siehe Tabelle 10-16)

Interessanterweise zeigen die österreichischen Ergebnisse eine tendenziell negative Assoziation zwischen dem Bauernstatus der Mutter und der IL-10-Produktion der CBMCs und ($p=0,056$, adjustierte Werte) (siehe Abb. 4.2.), die ebenfalls nicht für die Gesamtpopulation zu beobachten war. Das erscheint zunächst kontrovers zu der signifikant positiven Assoziation zwischen IL-10 und Heuschoberaufenthalt, halten sich doch österreichische Bauernfrauen signifikant häufiger in Heuschobern auf als die Frauen der österreichischen Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es Bauernhofvariablen gibt, die die fetalen T-Zellen in Richtung abnehmender IL-10-Produktion beeinflussen. Möglich ist, dass diese Variablen einen stärkeren Einfluss auf die Entwicklung des fetalen Immunsystems haben als der maternale Aufenthalt in Heuschobern, so dass die Kombination der Variablen in insgesamt erniedrigter IL-10-Produktion in Assoziation zum Bauernstatus resultiert.

Für IL-10 konnten innerhalb der Gesamtpopulation keine signifikanten Assoziationen zu maternalen Expositionen hergestellt werden. Die österreichischen Werte zeigen sogar negative Assoziationen zwischen IL-10 und dem Bauernstatus an sich. Der modifizierten Version der Hygienehypothese entsprechend, die von einer zentralen Rolle von IL-10 produzierenden Tregs ausgeht, hätten erhöhte IL-10-Werte erwartet werden können¹⁶⁸. Die Ergebnisse lassen jedoch nicht auf vermehrte T-regulatorische

Aktivität schließen. In diesem Zusammenhang könnte eine Untersuchung der m-RNA-Expression (FOXP3) in den Nabelschnurblutproben unserer Studienpopulation Hinweise auf die Einflüsse des Bauernhoflebens bezüglich der Entwicklung von Tregs liefern. Ob die innerhalb der österreichischen Proben gefundenen Assoziationen zwischen IL-10 und dem mütterlichen Heuschoberaufenthalt im Zusammenhang mit T-regulatorischer Aktivität stehen, könnte ebenfalls auf diese Weise geklärt werden.

IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von allergischen, TH2-vermittelten Immunantworten^{9,73,148}. IL-10 fördert die Entwicklung von Tregs und den Antikörperwechsel von IgE zu IgG4^{2,3}. Zwischen IL-10-Konzentrationen allergischer Patienten und dem Schweregrad der allergischen Erkrankung^{59,89}, sowie Allergien an sich¹⁷⁵, konnten inverse Assoziationen nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine reduzierte IL-10-Produktion von polyklonal stimulierten Nabelschnurblutzellen in Verbindung gebracht werden mit der Sensibilisierung gegenüber Ei im ersten Lebensjahr¹⁰⁹, welches wiederum ein Risikofaktor für die Entstehung allergischer Erkrankungen wie atopische Dermatitis, allergische Rhinitis und Asthma ist^{57,177}. Auch ein direkter Zusammenhang konnte nachgewiesen werden zwischen reduzierten IL-10-Konzentrationen Neugeborener und späterer Entwicklung von Atopie^{116,124}. Einige Studien konnten jedoch auch eine positive Assoziation zwischen der Konzentration von IL-10 und allergischer Sensibilisierung¹⁰⁷ sowie Intensität allergischer Symptome¹⁰³ feststellen, allerdings beziehen sich diese Untersuchungen auf reife Immunzellen und nicht auf Nabelschnurblutzellen.

IL-10 ist beteiligt bei der Entwicklung von Toleranz gegenüber Antigenen. Akbari et al. zeigten, dass Toleranz, die induziert wird durch respiratorische Exposition gegenüber hohen intranasal applizierten Allergendosen, die Entwicklung von bronchialer Hyperreaktivität inhibiert. Außerdem werden pulmonale Dendritische Zellen dazu veranlasst die Induktion von IL-10 produzierenden Tregs zu unterstützen^{2,3}. Untersuchungen in Mausmodellen zeigen, dass Dendritische Zellen, die sich in der Schleimhaut der Lunge befinden, durch Stallstaubextrakt tolerant gegenüber bestimmten Allergenen werden. Nach der Induktion durch den Extrakt verlieren die Dendritischen Zellen zeitweise ihre Phagozytosefähigkeit und entwickeln sich vorzeitig zu reifen Dendritischen Zellen¹²⁰.

Derzeit werden Behandlungsmethoden allergischer Erkrankungen diskutiert, die auf einer Aktivierung der Tregs abzielen, da gezeigt werden konnte, dass eine Induktion der IL-10-Synthese assoziiert ist mit einer Verbesserung der Krankheitssymptome^{4,58,74}. Die derzeit praktizierte Immunotherapie, die eine Besserung allergischer Symptome allergischer Patienten bewirkt, geht ebenfalls mit erhöhten IL-10-Spiegeln einher¹¹².

Die erhöhte IL-10-Produktion der CBMCs, die mit der Heuschober-Exposition der österreichischen Mütter während der Schwangerschaft einhergeht, könnte ein Hinweis sein auf vermehrte T-regulatorische Aktivität und eventuell auch auf ein vermindertes Risiko für die Entwicklung von allergischen Erkrankungen. Dagegen jedoch spricht, dass der Bauernstatus der österreichischen Kinder an sich mit erniedrigten IL-10-Werten einhergeht, wobei Studien den Bauernstatus auch innerhalb Österreichs mit erniedrigtem Atopierisiko verknüpfen konnten.

Der Bauernstatus der österreichischen Neugeborenen an sich geht nicht einher mit einer Konzentrationserhöhung von IFN- γ und TNF- α , wie es für die Gesamtpopulation der Fall ist (adjustierte Werte). Für die Gesamtpopulation wurde gezeigt, dass die erhöht gemessenen IFN- γ -Werte der Bauernkinder vor allem durch den Kontakt der Mütter zu Stalltieren erklärt werden können. So ist es wahrscheinlich, dass die fehlende Assoziation zwischen IFN- γ -Konzentrationen und Bauernstatus innerhalb der österreichischen Studienpopulation vor allem darauf zurückzuführen ist, dass der Stalltierkontakt der österreichischen Frauen nicht mit erhöhten IFN- γ -Werten einhergeht. Und tatsächlich scheint der Kontakt der Österreicherinnen zu Stalltieren keinen Einfluss auf die IFN- γ -Produktion der CBMCs ihrer Kinder zu haben. Warum ruft der Tierkontakt in Österreich nicht die gleichen Zytokinveränderungen hervor wie innerhalb der Gesamtpopulation?

Möglich wäre, dass diese Unterschiede zurückzuführen sind auf regionale Unterschiede bezüglich des Viehbestandes oder der Viehzahl, der Belüftung im Stall oder zum Beispiel dem Tierfutter. Die Tierbestände der Bauern unterscheiden sich tatsächlich. Während nur 40,8% der bäuerlichen Betriebe der Gesamtpopulation Geflügel aufziehen, betreiben 64,8% der österreichischen Bauern Geflügelzucht (Pasture: Final Report). Diesen Angaben entsprechend gaben nur 31,7% der Bäuerinnen der Gesamtpopulation an, mehr als einmal im Monat Kontakt zu Geflügel gehabt zu haben, während 60,4%

der österreichischen Bauernfrauen entsprechenden Geflügelkontakt hatten während der Schwangerschaft.

Bezüglich des Einflusses des Stalltierkontaktes konnten Ege et al. 2006 zeigen, dass der Kontakt zu Kühen während der Schwangerschaft einen stärkeren konzentrationssteigernden Effekt auf die TH1-Zytokin-Produktion von CBMCs hat als der Kontakt zu Schweinen, Geflügel oder Schafen ⁴⁷. Innerhalb der PASTURE-Studienpopulation scheint der Kontakt zu Kühen der Bauernfrauen Österreichs während ihrer Schwangerschaft jedoch ungefähr dem Kontakt zu Kühen der Gesamtpopulation zu entsprechen (91,6% vs. 88,9%). Allerdings finden sich in den österreichischen Ställen häufiger weniger Kühe als es im Durchschnitt für die Gesamtpopulation beobachtet werden kann (<20 Kühe: Österreich: 76,2%, Gesamtpopulation: 46%) (Pasture: Final Report). Großbetriebe mit mehr als 40 Kühen stellen in Österreich nur 2% der Bauernhöfe dar, in der Gesamtpopulation jedoch 15,8% der bäuerlichen Betriebe (Pasture: Final Report).

Die gleichen Unterschiede können, wenn auch nicht in gleicher Ausprägung, auch für andere Viehbestände beobachtet werden: in Österreich ist der Anteil der Kleinbetriebe größer als in der Gesamtpopulation. Haben also die österreichischen Frauen Kontakt zu insgesamt weniger Tieren sowie Tierdung, und sind damit insgesamt weniger Bakterien und anderen mikrobiellen Komponenten, wie z.B. auch Endotoxin, ausgesetzt, könnte auch die Aktivierung des fetalen Immunsystems anders ausfallen, was sich auf die IFN- γ -Produktion der CBMCs auswirken könnte. Delayre-Orthez et al. wiesen im Mausmodell dosisabhängige Effekte für LPS nach ⁴⁰. Vercelli brachte niedrige Expositionsmengen mikrobieller Komponenten mit einer TH2-Antwort in Verbindung, während er hohen Konzentrationen eine TH1-fördernde Wirkung zusprach ¹⁵⁶.

Bedeutung der Zytokinwerte im Bezug auf die Entwicklung von allergischen Erkrankungen

An der fetomaternalen Grenzfläche entstehen vor allem TH2-Zytokine, die das fetale Überleben unterstützen. Intrauterin liegt eine relative TH1-Schwäche vor, die auch postpartal noch zu beobachten ist und durch relativ niedrige IFN- γ -Level charakterisiert ist ⁶⁸. Die TH2-Polarisierung zu Beginn des Lebens wird schrittweise ersetzt durch eine TH1-Dominanz ⁶⁷. Innerhalb der ersten sechs Monate kommt es zu einer

Immundeviation und die Level der TH2-Zytokine (IL-5, IL10, IL-13), die als Antwort auf eine allergene Stimulation gebildet werden, nehmen kontinuierlich ab, während die IFN- γ -Produktion (TH1-Zytokin) zunimmt.

Bei atopischen Kindern könnte diese Immundeviation aufgrund einer genetischen Prädisposition oder aufgrund bestimmter Umweltfaktoren nach der Geburt nicht richtig funktionieren¹²⁴. Kinder, die atopische Beschwerden entwickeln, behalten das anfänglich TH2-polarisierte Zytokinprofil bei gleichzeitig niedriger IFN- γ -Produktion bei, oft auch bis in die spätere Kindheit oder bis ins Erwachsenenleben^{86,95,161}.

IFN- γ inhibiert die Bildung von TH2-Zellen¹³³. Niedrige IFN- γ -Konzentrationen bei Geburt, wie sie unter Kindern gefunden wurden, die im Laufe ihres Lebens atopische Erkrankungen^{81,150,154,162} bzw. allergische Sensibilisierung¹⁰⁹ entwickelten, könnten die postnatal stattfindende Verschiebung der Zytokinantworten beeinflussen und eine Explosion der TH2-Zytokinantworten begünstigen¹²⁴, die mit der Entstehung von allergischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden⁵⁹. Das könnte eine Erklärung sein für die Tatsache, dass reduzierte IFN- γ -Level bei Geburt mit einem erhöhten Risiko für allergische Sensibilisierung und allergische Erkrankungen verbunden sind und bei Individuen mit allergischen Erkrankungen ebenfalls beobachtet werden^{17,63,151}. Mit diesen Überlegungen einhergehend konnte wiederholt gezeigt werden, dass Neugeborene mit erhöhter IFN- γ - sowie TNF- α -Produktion im Nabelschnurblut ein geringeres Risiko für die Entwicklung von Allergien im späteren Leben aufwiesen^{55,93,109}. Erste Ergebnisse der PASTURE-Studie zeigen zudem eine inverse Korrelation zwischen der IFN- γ -Produktion von CBMCs und allergenspezifischen IgE-Antikörpern in Nabelschnurblut¹²¹.

Unsere Ergebnissen könnten demnach indirekt als Bestätigung dafür gesehen werden, dass der Bauernstaus der Mutter, der mit erhöhter IFN- γ und TNF- α -Produktion von CBMCs assoziiert werden konnte, einen intrauterin vermittelten allergieprotektiven Effekt auf das Kind hat^{44,47,130}.

Darüber hinaus kann aus unseren Ergebnissen geschlossen werden, dass der protektive Effekt des Bauernhoflebens vor allem durch den mütterlichen Kontakt zu Stalltieren sowie dem Aufenthalt der schwangeren Bäuerinnen in Heuschobern erklärt werden

kann. Das geht einher mit den Ergebnissen früherer Studien, die den pränatalen Kontakt zu Vieh durch Stalltierkontakt der Mutter mit einem geringeren Risiko für die Entwicklung allergischer Sensibilisierung und Allergie in Verbindung bringen konnten^{47,130}, sowie der Tatsache, dass der größte allergeo-protektive Effekt auf Bauernhöfen beobachtet werden konnte, zu denen Viehställe gehörten^{79,158}, sowie teilweise gar nicht nachzuweisen war auf Bauernhöfen ohne Viehzucht⁴⁵.

Ob nun die österreichischen Kinder vom Tierkontakt und Bauernstatus ihrer Mütter aufgrund eines fehlenden Effektes auf die IFN- γ -Produktion ihrer CBMCs weniger profitieren als die Kinder der Gesamtpopulation, wird sich im weiteren Verlauf der PASTURE-Studie zeigen. Frühere Studien wiesen auch innerhalb Österreichs einen allergieprotektiven Effekt für das Leben auf dem Bauernhof und die Arbeit der Mutter im Stall während der Schwangerschaft nach^{5,47,131}.

Frühere Studien zeigen, dass der Konsum von Bauernmilch im ersten Lebensjahr mit einem reduzierten Asthmarisiko für die Kinder einhergeht^{47,163}. Die ALEX-Studie konnte feststellen, dass die Prävalenz von Asthma, Heuschnupfen und atopischer Sensibilisierung unter Kindern, die nicht pasteurisierte Bauernmilch konsumiert hatten, signifikant niedriger war. Dabei schienen sich die beiden protektiven Faktoren Stallkontakt und Bauernmilch in ihren schützenden Eigenschaften zu addieren. Vor allem Konsum dieser Milch während der Schwangerschaft konnte mit positiven Effekten für die Kinder in Zusammenhang gebracht werden¹³⁰. Unsere Ergebnisse zeigen eine Assoziation zwischen dem Konsum von nicht entrahmter Bauernmilch während der Schwangerschaft und erhöhter IFN- γ -Produktion von CBMCs. Ausgehend von der Beobachtung, dass erhöhte IFN- γ -Produktion bei Geburt mit einem geringeren Risiko für die Entwicklung von Allergien verbunden ist, lässt dies auf einen pränatalen protektiven Effekt der Milch schließen und bestätigt damit die Ergebnisse der ALEX-Studie.

Prädiktiver Wert der Zytokinexpression von CBMCs

Großes Interesse besteht darin, einen prädiktiven Parameter zu finden, der schon bei Geburt des Kindes Aufschluss über ein eventuelles Risiko für die Entwicklung von allergischen Erkrankungen gibt. Interventionsmaßnahmen könnten früher und damit

effektiver angewendet werden. Neben der Konzentration von IgE im Nabelschnurblut, ist auch die Zytokinexpression in diesem Zusammenhang interessant. Die Interpretation der Zytokinexpressionen von CBMCs im Zusammenhang mit der Entstehung von allergischen Erkrankungen muss jedoch kritisch gesehen werden und kann aufgrund der geringen Anzahl von Studien, die dieses Thema behandeln, nicht abschließend beurteilt werden.

Derzeitige Ergebnisse sprechen den einzelnen Zytokinen einen geringeren prädiktiven Wert zu als dem Vorliegen einer positiven atopischen Familienanamnese^{6,123}. Bedeutung könnte aber der Erfassung bestimmter Zytokinmuster zukommen, wie sie in dieser Arbeit vorgenommen worden ist. In diesem Zusammenhang ist es bedauerlich, dass IL-12 aufgrund zu vieler Nullwerte von der statistischen Auswertung ausgeschlossen werden musste.

IL-12 wird von APCs, vor allem als Folge hoher Antigenkonzentrationen, gebildet. Genauso wie IFN- γ inhibiert es die TH2-Antwort⁹⁸ und hat darüber hinaus starke TH1 aktivierende Fähigkeiten. Es stimuliert so die Bildung von IFN- γ und TNF- α ⁸⁵. Es konnte gezeigt werden, dass allergisches Asthma mit einer verringerten Produktion von IL-12 einhergeht¹⁵³. Neugeborenen mit einem erhöhten atopischen Risiko zeigten eine geringere Anzahl IL-12-produzierender Zellen im Nabelschnurblut nach allergener Stimulation⁵¹. Eine weitere Studie konnte niedrige Mengen IL-12- und IFN- γ -produzierender Zellen im Nabelschnurblut in Zusammenhang bringen mit IgE vermittelter Sensibilisierung während der Kindheit¹¹⁰. Aufgrund der niedrigen IL-12-Level konnten wir keine Unterschiede zwischen Bauern- und Nicht-Bauernkindern feststellen. Dieses könnte bedeuten, dass die hier durchgeführte Stimulation von Vollblutproben zu schwach ist, um ausreichende IL-12-Level messen zu können.

Beeinflussen mikrobielle Komponenten die unterschiedliche Zytokinexpression Neugeborener? Potentielle Mechanismen des Bauerneffektes

Die Tatsache, dass maternale Expositionen zur Ausbildung von unterschiedlichen Zytokinprofilen bei den Neugeborenen führen, deutet darauf hin, dass die fetalen Zellen des angeborenen sowie des adaptiven Immunsystems auf übertragende Stimuli der maternalen Umwelt reagieren. Es finden Interaktionen zwischen Mutter und Fetus statt,

möglicherweise über die Plazenta oder über das Fruchtwasser, das den Feten umgibt. Unklar ist, ob bestimmte Zytokinmuster im Blut der Mutter die Entwicklung des fetalen Systems beeinflussen ⁶⁶, oder ob mikrobielle Expositionen über die Amnionflüssigkeit eine direkte Rolle spielen ⁶⁵, zum Beispiel über die Ausbildung einer immunologischen Toleranz. Da uns keine Angaben über die Zytokinkonzentrationen der maternalen Zirkulation vorliegen, konnten wir keine Aussagen zu potentiellen Korrelationen zwischen neonatalen und maternalen Zytokinmustern machen wie Brown et al. es für Hoch-Risiko-Kohorten machen konnten ²⁶.

Die genauen Mechanismen, die für die unterschiedlichen Zytokinprofile der Bauernkinder sowie den allergeo-protectiven Effekt des Bauernhoflebens verantwortlich sind, sind Gegenstand intensiver Forschung. Vermutlich interagieren bestimmte Umweltfaktoren, denen die Kinder intrauterin ausgesetzt sind, mit dem spezifischen Genotyp des Kindes und beeinflussen so die Entwicklung des Immunsystems. Dementsprechend sind die Kinder dann entweder eher geschützt vor der Entwicklung von Allergien oder prädisponiert für diese Erkrankungen ⁶⁴. Vor allem eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch mikrobielle Komponenten scheint eine protektive Rolle zu spielen ⁴⁷.

Das Leben auf dem Bauernhof und die damit verbundenen Expositionen sind gekennzeichnet durch eine hohe mikrobielle Last, eine spezifische Zusammensetzung aus Komponenten von Bakterien und Pilzen ⁵⁴. Besonders reich an solchen Komponenten ist der Dung des Viehs, der unter anderem Enterobakterien und psychrotrophe Spezies enthält ^{54,179}. Ege et al. zeigten eine inverse Assoziation zwischen mütterlicher Exposition zu Tierdung und der Konzentration allergenspezifischer IgE in Nabelschnurblut ⁴⁸.

Gramnegative Bakterien der Spezies *Acinetobacter* ¹⁰⁸, unter ihnen *Acinetobacter Iwoffii* sowie das grampositive Bakterium *Lactococcus lactis* ³⁹ konnten in Abklatschproben von Kuhstallstaub identifiziert werden. Für beide Bakterienarten konnte in murinen Modellen ein allergieprotektiver Effekt festgestellt werden ³⁹, der für *Acinetobacter Iwoffii* auch in pränatalen Modellen bestätigt werden konnte (persönliche Mitteilung Prof. Renz, Veröffentlichung in Vorbereitung): maternale Exposition zu *A. Iwoffii* führte zu einer abgeschwächten Entzündung der Luftwege und Hyperreagibilität

nach OVA-Sensibilisierung der Nachkommen. Der Staub von Tierställen selbst scheint einen antiallergischen Effekt zu haben, wie in murinen Modellen gezeigt werden konnte¹²⁰. Hohe Konzentrationen von Bakterien und Sporen finden sich auch im Heu, hier konnte vor allem der Genus *Bacillus* identifiziert werden, der ebenfalls einen protektiven Effekt auf die Allergieentstehung hat, wie in murinen Modellen herausgefunden werden konnte¹²⁶. Ege et al. zeigten, dass mütterlicher Heukontakt die protektiven Eigenschaften des Tierdungkontaktes verstärkt⁴⁸.

Auch Bauernmilch enthält viele mikrobielle Bestandteilen, vor allem Milchsäurebakterien wie *Lactococcus lactis*¹¹⁷.

Es wird vermutet, dass die Exposition hoher Konzentrationen mikrobieller Komponenten, wie sie auf Bauernhöfen gefunden werden, die TH1-Antwort fördert und dadurch TH2-Antworten, die mit der Entstehung von allergischen Erkrankungen assoziiert sind, unterdrückt. Zahlreiche Studien haben in diesem Zusammenhang die Effekte von Endotoxinen, die besonders in Tierställen in hohen Konzentrationen zu finden sind, untersucht. Aber auch in den Matratzen von Bauernkindern, sowie in denen von Nicht-Bauernkindern mit regelmäßigem Stallkontakt lassen sich höhere Endotoxinkonzentrationen messen als bei Nicht-Bauernfamilien¹³⁰.

Bakterielle Komponenten wie das LPS führen über eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu einer Triggerung der TH1-Antwort. TH1-Zellen sezernieren IFN- γ , das eine zellvermittelte Immunantwort stimuliert und, wie beschrieben, gleichzeitig die Entwicklung von TH2-Zellen antagonisiert und in ihrer Aktivität behindert^{94,118,133}. PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) mikrobieller Komponenten binden an spezifische PRRs (Pattern Recognition Receptors) von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) des angeborenen Immunsystems. Zu den PRRs gehört auch die Gruppe der Toll Like Rezeptoren (TLR)¹⁰⁴, unter ihnen TLR4, das aktiviert wird durch LPS¹⁴⁹. Die Aktivierung der PRRs stimuliert die Expression bestimmter kostimulatorischer Moleküle sowie die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen: TNF- α , Typ-I-Interferonen, IL-1, IL-6, IL-10 und IL-12¹³⁷. Viele dieser Zytokine fördern die Entwicklung von TH1-Zellen. Die Aktivierung von APCs über TLR triggert damit die TH1-vermittelte Immunantwort, wodurch wiederum die TH2-Antwort und damit die allergische Reaktion inhibiert werden. Eine vermehrte LPS- bzw. Endotoxinkonzentration, wie sie in Tierställen zu finden ist, bewirkt eine vermehrte

Expression der PRRs TLR4, TLR2 und CD14^{50,84} was die vermehrte Expression dieser PRRs an der Oberfläche von Leukozyten von Bauernkindern erklärt⁸⁴. Über eine Bindung des LPS an TLR4 und CD14 kommt es zu vermehrter IL-12-Sekretion und damit einer Unterdrückung der TH2- Antwort, was geringere IgE-Sekretion und damit geringere atopische Sensibilisierung nach sich zieht^{56,62,142}. Es konnte ein Zusammenhang nachgewiesen werden zwischen hohen Endotoxinkonzentrationen und niedrigeren Prävalenzen von allergischen Erkrankungen^{25,52,122}, der auch von der ALEX-Studie bestätigt werden konnte¹³⁰. Blümer et al.²² und Gerhold et al.⁵³ konnten in murinen Modellen zeigen, dass LPS auch intrauterin die Entstehung allergischer Erkrankungen beeinflussen kann: Die Behandlung der Mütter mit LPS führte zu einer reduzierten allergischen Entzündung der Luftwege der OVA-sensibilisierten Nachkommen.

Unsere Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass bäuerliche Expositionen das fetale Immunsystem in Richtung TH1-Antwort, charakterisiert durch erhöhte IFN- γ -Produktion, beeinflussen. Außerdem bieten sie Hinweise darauf, dass schon intrauterin ein „Priming“ stattfindet, das möglicherweise mit der Entwicklung von Gedächtniszellen einhergeht.

In epidemiologischen Studien, wie der PASTURE-Studie, muss ein Kompromiss eingegangen werden zwischen wissenschaftlichem Anspruch und tatsächlicher Machbarkeit. So wären im Zusammenhang mit den fetalen Zytokinmustern auch die mütterlichen Zytokinkonzentrationen interessant gewesen. Damit hätte besser unterschieden werden können zwischen einem durch mütterliche Zytokine vermittelten Effekt, bzw. einer direkten Wirkung von Allergenen und mikrobiellen Komponenten über das Fruchtwasser.

Kritisch zu betrachten bleibt darüber hinaus die Frage, ob die in dieser Arbeit vorgenommene Zytokinbestimmung in Vollblutproben, die sehr viele Zellen enthalten, sinnvoll ist. Möglicherweise ließen sich besserer Ergebnisse erzielen, wenn vor der Messung bestimmte Zellen (T-Lymphozyten) aus den Vollblutproben isoliert und dann gesondert stimuliert würden. Auf diese Weise könnten die gemessenen Zytokine noch direkter den Effektorstatus der T-Zellen anzeigen. Zu klären bleibt auch, in welchem Maße die Zytokinbestimmung einer so geringen aus der Nabelschnur entnommenen

Probenmenge überhaupt auf die komplette fetale Zirkulation sowie den immunologischen Status des Neugeborenen schließen lässt.

Darüber hinaus wäre es sicher sinnvoll, die Sensitivität der Messmethode zu erhöhen um eine größere Anzahl verwertbarer Werte zu erhalten. Dieses trifft vor allem auf die IL-12-Messung zu, deren Ergebnisse hier, aufgrund zu vieler Werte unterhalb der Abrissgrenze, nicht ausgewertet werden konnten.

Als problematisch ist auch der Ausschluss der französischen Proben anzusehen, deren Werte sich signifikant von denen der anderen Studienzentren unterscheiden. Es ist ein technischer Mangel vermutet worden, der allerdings nicht überprüft werden konnte, so dass der Ausschluss dieser Werte zu Selektion auf Kosten der Datenqualität geführt haben könnte.

Subgruppenanalysen werden in der Literatur sehr kritisch diskutiert. Für Österreich konnten, bis auf die Ergebnisse für IL-10, keine signifikanten Werte gemessen werden, so dass hier lediglich Tendenzen diskutiert werden konnten und die Frage nach länderspezifischen Unterschieden innerhalb der PASTURE-Population nicht abschließend geklärt werden konnte. Eine Ausweitung der österreichischen Fallzahl in nachfolgenden Untersuchungen könnte klären, ob dieses, wie vermutet, auf die geringe Anzahl österreichischer Proben (n=105) zurückzuführen ist.

Ausblick

Die Verbindung epidemiologischer und immunologischer Daten in dieser Arbeit geben neue Einblicke in die Programmierung des fetalen Immunsystems. Die Ergebnisse bestätigen unsere Arbeitshypothese, indem sie zeigen, dass pränatale Expositionen des Bauernhoflebens einen Einfluss haben auf die Zytokinproduktion von Nabelschnurblutzellen Neugeborener. Darüber hinaus zeichnen sich zentrumsspezifische Unterschiede der Zytokinexpression ab, die vermutlich auf Variabilität der einzelnen erfassten Expositionen zurückgeführt werden können, die landestypischen Unterschiede bestimmter landwirtschaftlicher Vorgehensweisen beinhaltet.

Im weiteren Verlauf der PASTURE-Studie wird sich zeigen, ob diese Zytokinmuster auch im Hinblick auf das Risiko für die Entstehung von allergischen Erkrankungen interpretiert werden können und damit prädiktiven Charakter haben. Vor dem Hintergrund der Hygienehypothese könnten sie so weitere Erkenntnisse über die Mechanismen, die für den protektiven Effekt des Bauernhoflebens verantwortlich sind, bieten. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte die Entwicklung zukünftiger Früherkennungs-, Präventions- und Behandlungsmethoden von allergischen Erkrankungen möglich werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Aaby P *et al.* Early BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau. *Clin Exp Allergy*. **30**, 644-50 (2000).
2. Akbari O, DeKruyff RH & Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* **2**, 725-31 (2001).
3. Akbari O *et al.* Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* **8**, 1024 (2002).
4. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B & Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest.* **102**, 98-106 (1998).
5. Alfven T *et al.* Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle--the PARSIFAL study. *Allergy*. **61**, 414-21 (2006).
6. Allam JP *et al.* In search for predictive factors for atopy in human cord blood. *Allergy*. **60**, 743-50 (2005).
7. Alm JS, Lilja G, Pershagen G & Scheynius A. BCG vaccination does not seem to prevent atopy in children with atopic heredity. *Allergy*. **53**, 537 (1998).
8. Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A & Pershagen G. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet*. **353**, 1485-8 (1999).
9. Arock M, Zuany-Amorim C, Singer M, Benhamou M & Pretolani M. Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *Eur. J Immunol.* **26**, 166-70 (1996).
10. Asher MI *et al.* Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. **368**, 733-43 (2006).
11. Averbeck M, Gebhardt C, Emmrich F, Treudler R & Simon JC. Immunologic principles of allergic disease. *J Dtsch. Dermatol. Ges.* **5**, 1015-128 (2007).
12. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N. Engl. J Med.* 911-20 (2002).
13. Banerjee B *et al.* Modulation of airway inflammation by immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of allergic aspergillosis. *Infect. Immun.* **72**, 6087-m694 (2004).
14. Barnes M *et al.* Crete: does farming explain urban and rural differences in atopy? *Clin Exp Allergy*. **31**, 1822-188 (2001).
15. Behrman, Kliegman Infections of the neonatal infant. *Nelson textbook of pediatrics, 16th Edition*. Philadelphia: WB Saunders, 538-43 (2000).

16. Bener A, Lestringant GG, Beshwari MM & Pasha MA. Respiratory symptoms, skin disorders and serum IgE levels in farm workers. *Allerg. Immunol (Paris)*. **31**, 52-6 (1999).
17. Benson M, Strannegard IL, Wennergren G & Strannegard O. Low levels of interferon-gamma in nasal fluid accompany raised levels of T-helper 2 cytokines in children with ongoing allergic rhinitis. *Pediatr. Allergy Immunol.* **11**, 20-8 (2000).
18. Berkman N *et al.* Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol.* **155**, 4412-448 (1995).
19. Bibi H *et al.* Comparison of positive allergy skin tests among asthmatic children from rural and urban areas living within small geographic area. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **88**, 416-20 (2002).
20. Bluestone JA & Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev Immunol.* **3**, 253-27 (2003).
21. Blumenthal MN. The role of genetics in the development of asthma and atopy. *Curr. Opin. Allergy Clin Immunol.* **5**, 141-15 (2005).
22. Blumer N, Herz U, Wegmann M & Renz H. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin Exp Allergy.* **35**, 397-402 (2005).
23. Braun-Fahrlander C. Allergic diseases in farmers' children. *Pediatr. Allergy Immunol.* **11**, 19-22 (2000).
24. Braun-Fahrlander C *et al.* Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy.* **29**, 28-34 (1999).
25. Braun-Fahrlander C *et al.* Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J Med.* **19;347**, 869-77 (2002).
26. Brown M *et al.* Correlation of human decidual and cord blood mononuclear cell cytokine production. *Hum. Immunol.* **65**, 1336-143 (2004).
27. Brown MA, Rad PY & Halonen MJ. Method of birth alters interferon-gamma and interleukin-12 production by cord blood mononuclear cells. *Pediatr. Allergy Immunol.* **14**, 106-11 (2003).
28. Busse WW & Rosenwasser LJ. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* **111**, S799-804 (2003).
29. Caramalho I *et al.* Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med.* **197**, 403-11 (2003).

30. Celedon JC *et al.* Day care attendance in early life, maternal history of asthma, and asthma at the age of 6 years. *Am J Respir Crit Care Med.* **167**, 1239-43 (2003).
31. Chomarat P, Rissoan MC, Banchereau J & Miossec P. Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp Med.* **177**, 523-57 (1993).
32. Clutterbuck EJ, Hirst EM & Sanderson CJ. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF. *Blood.* **73**, 1504-12 (1989).
33. Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ & Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med.* **182**, 1169-174 (1995).
34. Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat. Rev Immunol.* **4**, 978-88 (2004).
35. Corrigan CJ *et al.* CD4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin-5. Effect of glucocorticoid therapy. *Am Rev Respir Dis.* **147**, 540-57 (1993).
36. Costa JJ *et al.* Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor- α and macrophage inflammatory protein-1 α . *J Clin Invest.* **91**, 2673-284 (1993).
37. De Maeyer E & De Maeyer-Guignard J. Interferon-gamma. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 321-36 (1992).
38. de Waal Malefyt R *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* **174**, 915-24 (1991).
39. Debarry J *et al.* *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J Allergy Clin Immunol.* **119**, 1514-21 (2007).
40. Delayre-Orthez C, de Blay F, Frossard N & Pons F. Dose-dependent effects of endotoxins on allergen sensitization and challenge in the mouse. *Clin Exp Allergy.* **34**, 1789-195 (2004).
41. Devalia JL *et al.* Effect of nitrogen dioxide on synthesis of inflammatory cytokines expressed by human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **9**, 271-28 (1993).
42. Devereux G. The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat. Rev Immunol.* **6**, 869-74 (2006).
43. Donnelly RP, Freeman SL & Hayes MP. Inhibition of IL-10 expression by IFN- γ up-regulates transcription of TNF- α in human monocytes. *J Immunol.* **155**, 1420-147 (1995).

44. Douwes J *et al.* Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur. Respir J.* **32**, 603-11 (2008).
45. Downs SH *et al.* Having lived on a farm and protection against allergic diseases in Australia. *Clin Exp Allergy.* **31**, 570-5 (2001).
46. Eduard W, Omenaas E, Bakke PS, Douwes J & Heederik D. Atopic and non-atopic asthma in a farming and a general population. *Am J Ind. Med.* **46**, 396-9 (2004).
47. Ege MJ *et al.* Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol.* **117**, 817-23 (2006).
48. Ege MJ *et al.* Prenatal exposure to a farm environment modifies atopic sensitization at birth. *J Allergy Clin Immunol.* **122**, 407-44 (2008).
49. Ernst P & Cormier Y. Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm. *Am J Respir Crit Care Med.* **161**, 1563-6 (2000).
50. Flo TH *et al.* Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc. Biol.* **69**, 474-81 (2001).
51. Gabrielsson S *et al.* Influence of atopic heredity on IL-4-, IL-12- and IFN-gamma-producing cells in in vitro activated cord blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* **126**, 390-6 (2001).
52. Gehring U *et al.* Exposure to endotoxin decreases the risk of atopic eczema in infancy: a cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* **108**, 847-54 (2001).
53. Gerhold K *et al.* Prenatal initiation of endotoxin airway exposure prevents subsequent allergen-induced sensitization and airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol.* **118**, 666-73 (2006).
54. Gill JJ *et al.* Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**, 471-81 (2006).
55. Guerra S, Lohman IC, Halonen M, Martinez FD & Wright AL. Reduced interferon gamma production and soluble CD14 levels in early life predict recurrent wheezing by 1 year of age. *Am J Respir Crit Care Med.* **169**, 70-6 (2004).
56. Hailman E *et al.* Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med.* **179**, 269-77 (1994).
57. Hattevig G, Kjellman B & Bjorksten B. Clinical symptoms and IgE responses to common food proteins and inhalants in the first 7 years of life. *Clin Allergy.* **17**, 571-58 (1987).
58. Hawrylowicz C, Richards D, Loke TK, Corrigan C & Lee T. A defect in corticosteroid-induced IL-10 production in T lymphocytes from corticosteroid-resistant asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* **109**, 369-70 (2002).

59. Heaton T *et al.* An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet*. **365**, 142-19 (2005).
60. Heinrich J *et al.* Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. *Eur. Respir J.* **19**, 1040-106 (2002).
61. Hesselmar B, Aberg N, Aberg B, Eriksson B & Bjorksten B. Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development? *Clin Exp Allergy*. **29**, 611-67 (1999).
62. Hilkens CM, Kalinski P, de Boer M & Kapsenberg ML. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood*. **90**, 1920-196 (1997).
63. Hoekstra MO *et al.* Interleukin-4, interferon-gamma and interleukin-5 in peripheral blood of children with moderate atopic asthma. *Clin Exp Allergy*. **27**, 1254-160 (1997).
64. Hoffjan S *et al.* Gene-environment interaction effects on the development of immune responses in the 1st year of life. *Am J Hum. Genet.* **76**, 696-704 (2005).
65. Holloway JA *et al.* Detection of house-dust-mite allergen in amniotic fluid and umbilical-cord blood. *Lancet*. **356**, 1900-192 (2000).
66. Holt P, Naspitiz C & Warner JO. Early immunological influences. *Chem. Immunol Allergy*. **84**, 102-27 (2004).
67. Holt PG. Primary allergic sensitization to environmental antigens: perinatal T cell priming as a determinant of responder phenotype in adulthood. *J Exp Med*. **183**, 1297-301 (1996).
68. Holt PG *et al.* Genetic 'risk' for atopy is associated with delayed postnatal maturation of T-cell competence. *Clin Exp Allergy*. **22**, 1093-9 (1992).
69. Hoppin JA, Umbach DM, London SJ, Alavanja MC & Sandler DP. Animal production and wheeze in the Agricultural Health Study: interactions with atopy, asthma, and smoking. *Occup. Environ. Med.* **60**, e3 (2003).
70. Horak F Jr *et al.* Parental farming protects children against atopy: longitudinal evidence involving skin prick tests. *Clin Exp Allergy*. **32**, 1155-119 (2002).
71. Illi S *et al.* Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ*. **322**, 390-5 (2001).
72. Ise W *et al.* Naive CD4+ T cells exhibit distinct expression patterns of cytokines and cell surface molecules on their primary responses to varying doses of antigen. *J Immunol*. **168**, 3242-350 (2002).
73. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF & Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol*. **160**, 3555-361 (1998).

74. John M *et al.* Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1 α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* **157**, 256-62 (1998).
75. Julge K, Vasar M & Bjorksten B. Development of allergy and IgE antibodies during the first five years of life in Estonian children. *Clin Exp Allergy.* **31**, 1854-61 (2001).
76. Jutel M *et al.* Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol.* **154**, 4187-494 (1995).
77. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H & Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* **361**, 1869-71 (2003).
78. Kauffmann F, Oryszczyn MP & Maccario J. The protective role of country living on skin prick tests, immunoglobulin E and asthma in adults from the Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyper-responsiveness and atopy. *Clin Exp Allergy.* **32**, 379-86 (2002).
79. Kilpelainen M, Terho EO, Helenius H & Koskenvuo M. Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin Exp Allergy.* **30**, 201-28 (2000).
80. Kiniwa M *et al.* Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest.* **90**, 262-6 (1992).
81. Kondo N *et al.* Reduced interferon gamma production by antigen-stimulated cord blood mononuclear cells is a risk factor of allergic disorders--6-year follow-up study. *Clin Exp Allergy.* **28**, 1340-4 (1998).
82. Koning H, Neijens HJ, Baert MR, Oranje AP & Savelkoul HF. T cell subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. I. Analysis of IL-4, IFN-gamma and IL-13 mRNA expression and protein production. *Cytokine.* **9**, 416-26 (1997).
83. Kruisselbrink A, Heijne Den Bak-Glashouwer MJ, Havenith CE, Thole JE & Janssen R. Recombinant *Lactobacillus plantarum* inhibits house dust mite-specific T-cell responses. *Clin Exp Immunol.* **126**, 2-8 (2001).
84. Lauener RP *et al.* Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet.* **360**, 465-6 (2002).
85. Lee SM, Suen Y, Qian J, Knoppel E & Cairo MS. The regulation and biological activity of interleukin 12. *Leuk. Lymphoma.* **29**, 427-38 (1998).
86. Leonard C, Tormey V, Burke C & Poulter LW. Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **17**, 368-75 (1997).

87. Levy DA. Parasites and allergy: from IgE to Th1/Th2 and beyond. *Clin Rev Allergy Immunol.* **26**, 1-4 (2004).
88. Leynaert B *et al.* Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood? *Am J Respir Crit Care Med.* **164**, 1829-34 (2001).
89. Lim S, Crawley E, Woo P & Barnes PJ. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet.* **352**, 113 (1998).
90. Ling EM *et al.* Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet.* **363**, 608-15 (2004).
91. Lopez AF *et al.* Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med.* **167**, 219-24 (1988).
92. Macatonia SE *et al.* Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol.* **154**, 5071-509 (1995).
93. Macaubas C *et al.* Association between antenatal cytokine production and the development of atopy and asthma at age 6 years. *Lancet.* **362**, 1192-7 (2003).
94. Maggi E *et al.* Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol.* **148**, 2142-217 (1992).
95. Magnan AO *et al.* Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* **161**, 1790-6 (2000).
96. Malamitsi-Puchner A *et al.* The influence of the mode of delivery on circulating cytokine concentrations in the perinatal period. *Early Hum. Dev.* **81**, 387-92 (2005).
97. Male D, Brostoff J, Roth DB & Roitt I., Role of T cells in the immune response to inhalant allergens: IgE production is dependent on TH2 cells, *Immunology*, 7th Edition, 428 (2006).
98. Manetti R *et al.* Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med.* **177**, 1199-204 (1993).
99. Marks GB. Environmental factors and gene-environment interactions in the aetiology of asthma. *Clin Exp Pharmacol. Physiol.* **33**, 285-29 (2006).
100. Marschan E *et al.* Increased activation of GATA-3, IL-2 and IL-5 of cord blood mononuclear cells in infants with IgE sensitization. *Pediatr. Allergy Immunol.* **19**, 132-9 (2008).
101. Martinez FD & Holt PG. Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma. *Lancet.* **354** Suppl. 2:SII12-5 (1999).

102. Matricardi PM, Rosmini F, Panetta V, Ferrigno L & Bonini S. Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States. *J Allergy Clin Immunol.* **110**, 381-7 (2002).
103. Matsumoto K *et al.* IL-10 production in circulating T cells differs between allergen-induced isolated early and dual asthmatic responders. *J Allergy Clin Immunol.* **109**, 281-6 (2002).
104. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev Immunol.* **1**, 135-45 (2001).
105. Middleton E, Reed CE. Development and prevention of allergic disease in childhood. *Allergy principles and practice. Volume II, 3rd Edition*, St. Louis: The C.V. Mosby Co; p. 930-68 (1988).
106. Morar N, Willis-Owen SA, Moffatt MF & Cookson WO. The genetics of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* **118**, 24-34 (2006).
107. Moverare R, Elfman L, Stalenheim G & Bjornsson E. Study of the Th1/Th2 balance, including IL-10 production, in cultures of peripheral blood mononuclear cells from birch-pollen-allergic patients. *Allergy.* **55**, 171-5. (2000).
108. Munsch-Alatossava P & Alatossava T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiol. Res.* **161**, 334-46 (2006).
109. Neaville WA *et al.* Developmental cytokine response profiles and the clinical and immunologic expression of atopy during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol.* **112**, 740-76 (2003).
110. Nilsson C *et al.* Low numbers of interleukin-12-producing cord blood mononuclear cells and immunoglobulin E sensitization in early childhood. *Clin Exp Allergy.* **34**, 373-80 (2004).
111. Nilsson L, Castor O, Lofman O, Magnusson A & Kjellman NI. Allergic disease in teenagers in relation to urban or rural residence at various stages of childhood. *Allergy.* **54**, 716-21 (1999).
112. Nouri-Aria KT *et al.* Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol.* **172**, 3252-329 (2004).
113. Nowak D *et al.* Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: west and east Germany. *Eur. Respir J.* **9**, 2541-52 (1996).
114. O'Garra A & Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* **10**, 542-50 (2000).
115. O'Garra A & Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.* **10**, 801-85 (2004).
116. Oddy WH *et al.* TGF-beta in human milk is associated with wheeze in infancy. *J Allergy Clin Immunol.* **112**, 723-78 (2003).

117. Ogier JC, Son O, Gruss A, Tailliez P & Delacroix-Buchet A. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3691-701 (2002).
118. Parronchi P *et al.* IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol.* **149**, 2977-83 (1992).
119. Perkin MR & Strachan DP. Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J Allergy Clin Immunol.* **117**, 1374-181 (2006).
120. Peters M *et al.* Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Thorax.* **61**, 134-9 (2006).
121. Pfefferle PI *et al.* Cord blood allergen-specific IgE is associated with reduced IFN-gamma production by cord blood cells: the Protection against Allergy-Study in Rural Environments (PASTURE) Study. *J Allergy Clin Immunol.* **122**, 711-6 (2008).
122. Phipatanakul W *et al.* Endotoxin exposure and eczema in the first year of life. *Pediatrics.* **114**, 13-8 (2004).
123. Prescott SL, King B, Strong TL & Holt PG. The value of perinatal immune responses in predicting allergic disease at 6 years of age. *Allergy.* **58**, 1187-194 (2003).
124. Prescott SL *et al.* Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet.* **353**, 196-200 (1999).
125. Raulf-Heimsoth M, Reske-Kunz AB T-Lymphozyten und ihre Zytokine. *Allergo J.* **12**, 125-127 (2003).
126. Reboux G *et al.* Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finnish and French farms. *Ann. Agric. Environ. Med.* **13**, 267-73 (2006).
127. Remes ST, Iivanainen K, Koskela H & Pekkanen J. Which factors explain the lower prevalence of atopy amongst farmers' children? *Clin Exp Allergy.* **33**, 427-34 (2003).
128. Renz H. Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. de Gruyter Verlag (2003).
129. Renz H *et al.* T(H)1/T(H)2 immune response profiles differ between atopic children in eastern and western Germany. *J Allergy Clin Immunol.* **109**, 338-42 (2002).
130. Riedler J *et al.* Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet.* **358**, 1129-133 (2001).

131. Riedler J, Eder W, Oberfeld G & Schreuer M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy*. **30**, 194-200 (2000).
132. Romagnani S. Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol Today*. **11**, 316-21 (1990).
133. Romagnani S. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol*. **113**, 395-400 (2004).
134. Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. **105**, 399-408 (2000).
135. Roponen M, Hyvarinen A, Hirvonen MR, Keski-Nisula L & Pekkanen J. Change in IFN-gamma-producing capacity in early life and exposure to environmental microbes. *J Allergy Clin Immunol*. **116**, 1048-52 (2005).
136. Roy SR, Schiltz AM, Marotta A, Shen Y & Liu AH. Bacterial DNA in house and farm barn dust. *J Allergy Clin Immunol*. **112**, 571-58 (2003).
137. Sabroe I *et al*. Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain. *J Immunol*. **171**, 1630-165 (2003).
138. Sallusto F & Lanzavecchia A. The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res*. **4**, 127-32 (2002).
139. Sarandakou A *et al*. Inflammatory cytokines in newborn infants. *Mediators Inflamm*. **7**, 309-12 (1998).
140. Sayers I *et al*. Suppression of allergic airway disease using mycobacterial lipoglycans. *J Allergy Clin Immunol*. **114**, 302-39 (2004).
141. Schandene L *et al*. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol*. **152**, 4368-474 (1994).
142. Schumann RR. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res. Immunol*. **143**, 11-5 (1992).
143. Stick SM, Burton PR, Gurrin L, Sly PD & LeSouef PN. Effects of maternal smoking during pregnancy and a family history of asthma on respiratory function in newborn infants. *Lancet*. **348**, 1060-4 (1996).
144. Stock P, DeKruyff RH & Umetsu DT. Inhibition of the allergic response by regulatory T cells. *Curr. Opin. Allergy Clin Immunol*. **6**, 12-6 (2006).
145. Strachan D *et al*. Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatr. Allergy Immunol*. **8**, 161-76 (1997).
146. Strachan DP. Allergy and family size: a riddle worth solving. *Clin Exp Allergy*. **27**, 235-26 (1997).

147. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. **299**, 1259-160 (1989).
148. Takanashi S *et al.* Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med*. **180**, 711-75 (1994).
149. Takeda K, Kaisho T & Akira S. Toll-like receptors. *Annu. Rev Immunol*. 335-76 (2003).
150. Tang ML, Kemp AS, Thorburn J & Hill DJ. Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet*. **344**, 983-5 (1994).
151. Tang ML, Varigos G & Kemp AS. Reduced interferon-gamma (IFN-gamma) secretion with increased IFN-gamma mRNA expression in atopic dermatitis: evidence for a post-transcriptional defect. *Clin Exp Immunol*. **97**, 483-90 (1994).
152. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev Immunol*. **13**, 251-76 (1995).
153. van der Pouw Kraan TC *et al.* Reduced production of IL-12 and IL-12-dependent IFN-gamma release in patients with allergic asthma. *J Immunol*. **158**, 5560-5 (1997).
154. van der Velden VH *et al.* Selective development of a strong Th2 cytokine profile in high-risk children who develop atopy: risk factors and regulatory role of IFN-gamma, IL-4 and IL-10. *Clin Exp Allergy*. **31**, 997-1006 (2001).
155. van Strien RT *et al.* Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J Allergy Clin Immunol*. **113**, 860-87 (2004).
156. Vercelli D. Learning from discrepancies: CD14 polymorphisms, atopy and the endotoxin switch. *Clin Exp Allergy*. **33**, 153-5 (2003).
157. Vogelzang PF, van der Gulden JW, Tielen MJ, Folgering H & van Schayck CP. Health-based selection for asthma, but not for chronic bronchitis, in pig farmers: an evidence-based hypothesis. *Eur. Respir J*. **13**, 187-19 (1999).
158. Von Ehrenstein OS *et al.* Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy*. **30**, 187-93 (2000).
159. von Mutius E, Illi S, Nicolai T & Martinez FD. Relation of indoor heating with asthma, allergic sensitisation, and bronchial responsiveness: survey of children in south Bavaria. *BMJ*. **312**, 1448-150 (1996).
160. von Mutius E & Schmid S. The PASTURE project: EU support for the improvement of knowledge about risk factors and preventive factors for atopy in Europe. *Allergy*. **61**, 407-13 (2006).

161. Walker C *et al.* Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis.* **146**, 109-15 (1992).
162. Warner JA *et al.* Is deficiency of interferon gamma production by allergen triggered cord blood cells a predictor of atopic eczema? *Clin Exp Allergy.* **24**, 423-30 (1994).
163. Waser M *et al.* Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy.* **37**, 661-70 (2007).
164. Webber MP, Carpiello KE, Oruwariye T & Appel DK. Prevalence of asthma and asthma-like symptoms in inner-city elementary schoolchildren. *Pediatr. Pulmonol.* **34**, 105-11 (2002).
165. Weigt H, Muhlradt PF, Emmendorffer A, Krug N & Braun A. Synthetic mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 induces maturation and function of dendritic cells. *Immunobiology.* **207**, 223-33 (1993).
166. Weiland SK *et al.* Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur. Respir J.* **14**, 862-70 (1999).
167. Williams LK, Peterson EL, Ownby DR & Johnson CC. The relationship between early fever and allergic sensitization at age 6 to 7 years. *J Allergy Clin Immunol.* **113**, 291-6 (2004).
168. Wills-Karp M, Santeliz J & Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat. Rev Immunol.* **1**, 69-75 (2001).
169. World Health Organization. Prevention of Allergy and Allergic Asthma. (2003).
170. World Health Organization. WHO-Bericht atopischer Erkrankungen;Faktenblatt EURO/01/03 Kopenhagen, Bonn, Brüssel, Moskau, Oslo, Rom und Stockholm, Umweltgefahren lösen bei Kindern Allergien aus. (2003).
171. World Health Organization. Asthma. *Fact sheet*, No. **307** (2006).
172. World Health Organization. Prevalence of asthma and allergies in children. *WHO fact sheet*, No. **3.1**. (2007).
173. Xystrakis E, Boswell SE & Hawrylowicz CM. T regulatory cells and the control of allergic disease. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **6**, 121-33 (2006).
174. Yamaguchi Y *et al.* Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med.* **167**, 1737-42 (1988).
175. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG & van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science.* **296**, 490-4 (2002).

176. Yemaneberhan H *et al.* Prevalence of wheeze and asthma and relation to atopy in urban and rural Ethiopia. *Lancet.* **350**, 85-90 (1997).
177. Zeiger RS & Heller S. The development and prediction of atopy in high-risk children: follow-up at age seven years in a prospective randomized study of combined maternal and infant food allergen avoidance. *J Allergy Clin Immunol.* **95**, 1179-190 (1995).
178. Zizka J *et al.* Perinatal period cytokines related to increased risk of future allergy development. *Folia Microbiol. (Praha).* **52**, 549-55 (2007).
179. Zucker BA & Muller W. [Investigations on airborne microorganisms in animal stables. 3: Relationship between inhalable endotoxin, inhalable dust and airborne bacteria in a hen house]. *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **113**, 279-83 (2000).

6. Anhang

6.1. Materialübersicht

Artikel	Bezeichnung	Firma
384-Well-Platte	384 well clear Macisorp	NUNC A/S
BM blue POD-Substrat	3,3'-5,5'- Tetramethylbenzidin (TMB)	Roche Diagnostics Corporation
Desinfektionsmittel	Softasept	Reagenzienzentrale
Eis		
Eisschale		
ELISA-Reader	Tecan	GENios
ELISA-Reader-Software	Magellan 3	
FCS	Fetal calf serum Gold	PAA Laboratories GmbH
Feinwaage		
Finnpipette	300 µl (automatisch)	Labsystems
H ₂ SO ₄	2 mmol/l	
Handschuhe unsteril	Gr. 6,5	
Kühlschrank	2-6°C	
Kühlschrank	-80°C	
Opt-EIA ALISA Kit IFN-γ	Capture Antibody Detection Antibody Enzym Reagenz Standard	BD Biosciences Pharmingen
Opt-EIA ALISA Kit IL-5	Capture Antibody Detection Antibody Enzym Reagenz Standard	BD Biosciences Pharmingen
Opt-EIA ALISA Kit IL-10	Capture Antibody Detection Antibody Enzym Reagenz Standard	BD Biosciences Pharmingen
Opt-EIA ALISA Kit IL-12	Capture Antibody Detection Antibody Enzym Reagenz Standard	BD Biosciences Pharmingen
Opt-EIA ALISA Kit TNF-α	Capture Antibody Detection Antibody Enzym Reagenz Standard	BD Biosciences Pharmingen
PBS	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline	PAA Laboratories GmbH
Pipetten	“reference” 10-100 µl (gelb) 0,5-10 µl (grau) 50-200 µl (gelb) 150-1000 µl (blau)	Eppendorf

	“research” 5000 µl (violett)	
Pipetten-Spitzen	Gelb Blau Lila Transparent	
Probenständer		
Reagiergefäße	Micro-Tubes Cryo-Tubes	
Schüttler		
Tween 20	Polyoxyethylene Sorbitant Monolaurate	Sigma
Verschlussfilm	Parafilm	
Vortexer		
Wasserbad		

7. Zusammenfassung

7.1. Deutsch

In den letzten Jahrzehnten ist die Prävalenz allergischer Erkrankungen dramatisch angestiegen. Europaweit sind derzeit mehr als 20% der Bevölkerung betroffen und die Tendenz ist weiterhin steigend. Ein Meilenstein der Allergieforschung stellt die 1989 von David P. Strachan aufgestellte Hygienehypothese dar, nach welcher der Prävalenzanstieg allergischer Erkrankungen in Verbindung gebracht werden kann mit verbesserten hygienischen Verhältnissen und abnehmender Infektionsrate in diesem Zeitraum.

Im Rahmen der Hygienehypothese ist der so genannte Bauerneffekt beschrieben worden. Kinder, die in der Umgebung eines traditionellen Bauernhofes aufgewachsen sind, leiden seltener unter IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen als ihre Altersgenossen. Dieser allergieprotektive Effekt des Bauernhoflebens wird nach neusten Ergebnissen epidemiologischer Studien nicht nur postnatal, sondern auch schon intrauterin vermittelt und lässt vermuten, dass sich schon bei neugeborenen Bauernkindern Unterschiede bezüglich des Immunstatus finden lassen.

ZIEL DER ARBEIT: Ziel der vorliegenden Arbeit, die im Rahmen der PASTURE-Studie angefertigt worden ist, war es zu untersuchen, inwieweit sich mütterliche Expositionen des traditionellen bäuerlichen Milieus auf den fetalen Immunstatus auswirken, vor allem im Hinblick auf Marker der TH1/TH2-Balance, den Zytokinen.

METHODEN: Dazu wurden die Konzentrationen folgender Zytokine in Nabelschnur-Vollblutproben neugeborener Kinder aus Bauern- und Nicht-Bauernumfeld nach mitogener Stimulation mit PMA/Ionomycin bestimmt: IL-5 (spiegelt TH2-Immunität wider), IL-10 (spiegelt Treg-Aktivität wieder), IFN- γ (spiegelt TH1-Immunität wider) sowie IL-12 und TNF- α (reflektieren Aktivität des angeborenen Immunsystems). Diese Zytokine liefern Hinweise auf den Effektorstatus der neonatalen T-Lymphozyten. Die Zytokinwerte wurden assoziiert mit demographischen Faktoren sowie typischen Expositionen des bäuerlichen Lebens, um genauer zu definieren, welche Umweltexpositionen im Einzelnen Einfluss nehmen auf die Zytokinmuster. Die hergestellten Assoziationen innerhalb der Gesamtpopulation der PASTURE-Studie

wurden des Weiteren verglichen werden mit den Ergebnissen der Teilstudienpopulation Österreich, um länderspezifische Unterschiede hinsichtlich Expositionen und Zytokinwerten innerhalb der PASTURE-Population aufzudecken.

ERGEBNISSE: Die Ergebnisse zeigen, dass pränatale Expositionen des Bauernhoflebens einen Einfluss haben auf die Zytokinproduktion von Nabelschnurblutzellen Neugeborener. Vor allem für die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ (TH1-Zellen: erworbenes Immunsystem) und TNF- α (angeborenes Immunsystem) stellen sich signifikante positive Assoziationen zum Bauernstatus dar, die für IFN- γ vor allem mit dem mütterlichen Kontakt zu Stalltieren während der Schwangerschaft in Verbindung gebracht werden konnten.

Es zeichnen sich Unterschiede zwischen der Subpopulation Österreich und der PASTURE-Gesamtpopulation bezüglich der Zytokinexpression ab, die vermutlich auf Variabilität der einzelnen erfassten Expositionen zurückgeführt werden können, die landestypische Unterschiede bestimmter landwirtschaftlicher Vorgehensweisen beinhaltet. Während sich in der Auswertung der österreichischen Daten keine signifikante Assoziationen zwischen den untersuchten Variablen und den Werten der proinflammatorischen Zytokine im Nabelschnurblut zeigten, konnte ein konzentrationssteigernder Effekt auf die IL-10-Werte für den Aufenthalt der Mutter in Heuschobern während der Schwangerschaft nachgewiesen werden.

SCHLUSSFOLGERUNG: Die Verbindung epidemiologischer und immunologischer Daten in dieser Arbeit geben neue Einblicke in die Programmierung des fetalen Immunsystems. Das traditionelle Bauernmilieu beeinflusst bereits pränatal die Entwicklung des fetalen Immunsystems in Richtung einer TH1-basierten Immunantwort. Besonders stark ist dieser Effekt, wenn die schwangere Mutter Kontakt zu Stalltieren hatte. Die Assoziation der frühen TH1-Antwort mit der späteren Allergieentwicklung des Kindes soll im Verlauf der PASTURE-Studie den Zusammenhang zwischen der verschobenen Immunantwort und einer möglicherweise damit verbundenen Allergieprotektion klären.

7.2. Englisch

Allergic disorders have become a major public health problem in industrialized countries. There has been a continuous increase in their prevalence and incidence. At present more than 20% of the European population suffers from allergic diseases. The aetiology of allergic diseases remains poorly understood despite considerable research. In 1989, the concept of the Hygiene Hypothesis was proposed by Strachan et al.. It states that high living standards and hygienic conditions are correlated with an increased risk for the development of allergic diseases. In further studies, it could be shown that children growing up on a farm had a lower prevalence of IgE-mediated allergic diseases than their peers living in urban regions. Epidemiologic studies now indicate that this “farm effect” arises not only from postnatal but even prenatal farm exposures. Therefore it is supposable that the immune status of a newborn, born in close proximity to farm, already differs.

AIM: As part of the PASTURE-Project, the thesis is aimed to assess the effect of maternal traditional farm life exposure on the foetal immune status, particularly with regard to the markers of ‘TH1/TH2-lymphocytes’.

METHODS: IL-5 (reflecting TH2-immunity), IL-10 (reflecting Treg cells), IFN- γ (reflecting TH1-immunity), IL-12 and TNF- α (reflecting innate immunity) were measured quantitatively in cord blood samples of farm and non farm exposed newborns after stimulation with PMA/Ionomycin. This panel provides important insight into the overall status of T-cell effector function in the newborns. To investigate which particular environmental exposure has an effect on these cytokines, the results of the PASTURE population were associated with demographic factors and typical farm exposures. Furthermore, these associations were compared to an Austrian subpopulation to reveal country-specific differences with regard to exposures and cytokine expression within the population of the PASTURE-study.

RESULTS: Our results show that prenatal farm exposure affects the cytokine production of cord blood mononuclear cells. Significant positive associations could be found particularly between the proinflammatory cytokines IFN- γ (TH1-cells: adaptive immune system) and TNF- α (innate immune system) and the farm status.

The associations concerning IFN- γ could be linked mainly to maternal contact to farm animals during pregnancy.

Differences between the Austrian subpopulation and the whole PASTURE-population concerning cytokine expression became apparent, supposable due to variability of the engaged exposures, containing country specific differences of agricultural practices. No significant associations could be found in proinflammatory cytokines within the Austrian results. Our data shows an increasing effect of maternal exposure to hayricks during pregnancy in Austrian neonates for IL-10.

CONCLUSION: The combination of epidemiological and immunological results in this thesis provides new insights into priming and maturation of the foetal immune system. The traditional farm environment influences the developing immune system already prenatally towards a TH1-dominated immune profile, particularly when the mother has had contact with farm animals during pregnancy.

The association between the early TH1-response and the development of allergic diseases later on will be shown in the course of PASTURE-Study. In this way the relationship between the shifted immune response and a potentially associated protection against allergies will also be elucidated.

8. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten in Marburg:

Aumüller, Barth, Basler, Bauer, Baum, Becker, Berger, Bien, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Dietrich, Feuser, Görg, Gress, Grimm, Griss, Gotzen, Hertel, Herzum, Hofbauer, Hoffmann, Hoyer, Kaltenborn, Kann, Klose, Krieg, Kretschmer, Lill, Löffler, Löffler, Maier, Maisch, Mandrek, Meyer, Moll, Mutters, Mueller, Müller, Oertel, Neubauer, Renz, Remschmidt, Richter, Röhm, Rothmund, Rößer, Ruchholtz, Schäfer, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf.

In Zürich: Simmen, Wanner, Weder

In Bern: Meier, Suter, Windecker

9. Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Harald Renz, für die Überlassung des Themas sowie die nette und motivierende Betreuung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Dr. Dr. Petra Ina Pfefferle, die sich viel Zeit genommen hat für meine Arbeit und mir jederzeit mit gutem Rat zur Seite stand. Besser hätte eine Betreuung nicht sein können. Darüber hinaus danke ich Dr. Nicole Blümer, unter deren Anleitung ich die Arbeit begonnen habe. Außerdem möchte ich mich bei dem gesamten Laborteam ganz herzlich bedanken, vor allem bei Brigitte Auffahrt für die Einarbeitung in die Labormethoden und tatkräftige Hilfe bei der Bewältigung kleiner, alltäglicher Laborprobleme.

Dank gilt auch meinem Kommilitonen Markus Zimmermann, mit dem ich gemeinsam lange Tage im Labor verbracht habe und viele Fragen klären konnte. Die Teamarbeit hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Ebenfalls danke ich allen Familien, die durch ihr Einverständnis zur Nabelschnurblutentnahme diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern, ohne die mein Studium in dieser Form nicht möglich gewesen wäre und die mich in der Verwirklichung meiner Pläne und Wünsche stets unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt auch meinem Freund Christoph Albers für die viele Zeit, die er sich genommen hat um mich zu unterstützen und mit mir fachspezifische Fragen zu diskutieren, welches mir viel bedeutet hat und mir eine große Hilfe war, meinen Großeltern für die seelische Unterstützung und Motivation während der Anfertigung dieser Arbeit, meinem Onkel für die Hilfe in komplizierten Formatierungsangelegenheiten, ganz besonders Katja Zimmermann für die sorgfältige Korrektur von Rechtschreibfehlern sowie meinen Geschwistern und allen meinen Freunden, die mich in dieser Zeit unterstützt haben.

Vorliegende Arbeit wird in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

The Journal of Allergy and Clinical Immunology

Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy - The PASTUREStudy

Petra Ina Pfefferle PhD DrPH, Gisela Büchele MPH, Nicole Blümer PhD, Marjut Roponen PhD, Markus Johannes Ege MD, MPH, Susanne Krauss-Etschmann MD, Jon Genuneit, Anne Hyvärinen, PhD, Maija-Riitta Hirvonen PhD, Roger Lauener MD, Juha Pekkanen MD, Josef Riedler MD, Jean Charles Dalphin MD, PhD, Bert Brunekeef, PhD, Charlotte Braun-Fahrländer MD, Erika von Mutius MD MSc, Harald Renz MD and *the PASTURE Study group**

***The PASTURE study group:** Gertraud Weiß, Ellen Üblagger, Claudia Humer, Manuela Rußegger (Austria); Maija-Riitta Hirvonen, Raija Juntunen, Reetta Tiihonen, Pekka Tiittanen, Timo Kauppila, Aino Nevalainen, Sami Remes (Finland); Dominique A. Vuitton, Marie-Laure Dalphin, Renaud Piarroux, Gabriel Reboux, Sandrine Roussel, Bertrand Sudre (France); Bianca Schaub, Susanne Schmid, Sabina Illi, Nicola Korherr, Dorothee Quast, Markus Zimmermann (Germany); Sondhja Bitter, Felix H. Sennhauser, Susanne Loeliger, Johanna Steinle, Remo Frei (Switzerland).

Supported by the European Union (research grant QLK4-CT-2001-00250)